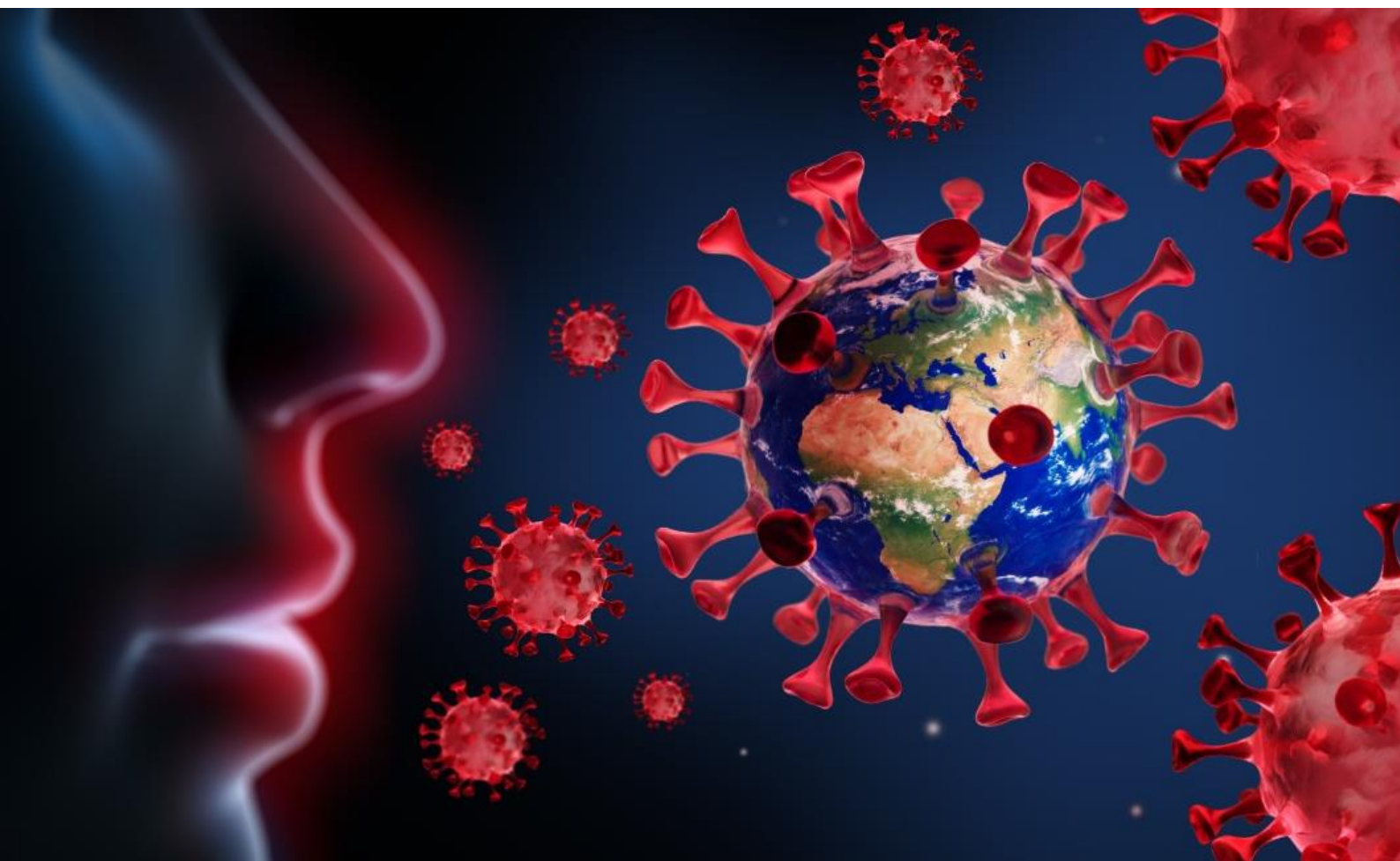


SEROLOGISK OG MUCOSALT ANTISTOFRESPONS EFTER PFIZER/BIONTECH BNT162B2 VACCINATION



PROFESSIONBACHELORPROJEKT 2021

Forskningsenheden for Molekylær Medicin
Rigshospitalet

Camilla Xenia Holtermann Jahn (60082224)
Sif Kaas Nielsen (60082262)

Mikkel-Ole Skjødt, MSc., Cand Scient., PhD, Senior Scientist, Associate professor, Rigshospitalet
Leif Kofoed Nielsen, Docent, Københavns Professionshøjskole

59.967 tegn uden mellemrum

Forord

Dette professionsbachelorprojekt er udført af Camilla Xenia Holtermann Jahn og Sif Kaas Nielsen, bioanalytikerstuderende på Københavns Professionshøjskole, Campus Sigurdsgade.

Den praktiske del af dette projekt er udført hos Forskningsenheden for Molekylær Medicin, Klinisk Immunologisk Afdeling på Rigshospitalet i foråret 2021.

Dette bachelorprojekt havde til formål at undersøge om hvordan det serologiske og mucosale slimhinde antistofrespons er hos COVID-19 Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinerede individer. Projektet henvender sig til alle sundhedsfaglige professioner med interesse for COVID-19 i forbindelse med vaccinerespons og vaccinemonitorering.

Vi vil gerne takke alle medarbejdere i Forskningsenheden for deres imødekommenhed og hjælpsomhed under vores klinikophold. En stor tak skal især gå til Cecilie Bo Hansen og Ida Jarlhelt med deres kæmpe hjælp i forbindelse med vores bachelorprojekt. Derudover vil vi gerne sige tak til vores campus vejleder Leif Kofoed Nielsen for hans støtte og hjælpsomhed. Slutteligt vil vi gerne takke vores kliniske vejleder Mikkel-Ole Skjødt for hans ekstraordinære hjælp igennem hele klinikperioden.

Resume

Baggrund: Den verdensomspændende COVID-19 pandemi forårsages af en ny type coronavirus kaldet SARS-CoV-2. I mange tilfælde optræder sygdommen asymptomatisk eller med meget milde influenza lignende symptomer men i værste fald kan den udvikle sig til en livstruende viruslungebetændelse. Der er ingen kurerende medicinsk behandling, men en COVID-19-vaccine kan give beskyttelse mod COVID-19. En undersøgelse af SARS-CoV-2 specifikke antistoffer er et vigtigt led i forståelse for, om hvorvidt vaccinen giver et beskyttende antistofrespons og hvordan det ændres over tid. Sammen med Forskningsgruppen for Molekylær Medicin (Klinisk Immunologisk afdeling, Rigshospitalet) har vi udviklet ELISA og Luminex platforme til at undersøge det serologiske og mucosale antistofrespons hos BNT162b2 Pfizer/BioNTech vaccinerede individer fra Region Hovedstaden.

Metode: Det serologiske antistofrespons undersøges i prøver fra 1110 patienter og 1460 sundhedspersonale, både naive og præ-immuniserede individer, som testes i to forskellige ELISA assays: Et direkte assay hvor der specifikt påvises SARS-CoV-2 antistoffer af isoklasserne IgM, A og G, samt et neutraliseringsassay hvor vi undersøger de specifikke antistoffers evne til at neutralisere interaktionen mellem det virale receptorbindingsdomæne (RBD) og den humane target receptor ACE-2. Dernæst undersøges det mucosale slimhinde antistofrespons IgM, A og G hos 108 patienter i Luminex assays. Til slut blev 70 patienters serologiske antistofrespons sammenlignet med det mucosale slimhinde antistofrespons ved hjælp af en komparativ analyse.

Resultat: Projektet viste, at BNT162b2-vaccinen udløser et serologisk målbart respons 3 uger efter vaccination. Størrelsen på dette respons afhænger af alder, køn og tidligere SARS-CoV-2-infektion (bedre respons hos kvinder, hos yngre personer og hos tidligere inficerede individer). Ligeledes viste projektet, at vaccinen resulterer i et væsentligt forøget dominerende IgG-antistofrespons og en signifikant andel af IgA-antistoffer efter første og anden vaccination. Slutteligt viste projektet en ikke signifikant korrelation mellem antistof-isoype-niveauerne i serum og spyt.

Konklusion: Det kan konkluderes, at BNT162b2-vaccinen inducerer et serologisk respons. Resultaterne viser at flere faktorer har indflydelse på dette, herunder alder og tidligere COVID-19-forløb. Ydermere viste projektet, at vaccinen inducerer humoral immunitet, hvor antistofresponsen domineres af IgG.

Forkortelser

ACE-2: Angiotensin converting enzyme 2 (angiotensin-konverterende enzym 2)

CoV: Coronavirus

COVID-19: Coronavirus sygdom 2019

BSA: Bovine serum albumin

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorid

GALT: Gut-associated lymphoid tissue (tarm-associeret lymfoidt væv)

HRP: Horseradish peroxidase (peberrod peroxidase)

HS-strep-HRP: High sensitivity-streptavidin-horseradish peroxidase (høj sensitivitet-streptavidin-peberrod peroxidase)

Ig: Immunoglobolin

MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue (slimhindeassocieret lymfoidt væv)

NHS: N-hydrosulfosuccinimide

OD: Optical density (optisk densitet)

PBS-T: Phosphat buffered saline tilsat 0.05% Tween.

Protein S: Spike protein

RBD: Receptorbindende domæne

RPM: Revolutions per minute (omdrejninger pr. minut)

SARS: Severe acute respiratory syndrome (svært akut luftvejssyndrom)

Indholdsfortegnelse

Forord.....	2
Resume.....	3
Forkortelser.....	4
Introduktion	7
Problembaggrund	7
Problemformulering.....	8
Delformuleringer.....	8
Teori	8
Det adaptive immunforsvar	9
Virusreplikation	9
SARS-CoV-2 virusstruktur	11
Vaccineudvikling.....	11
PFIZER/BioNTech BNT162b2 vaccine	13
ELISA analyseprincip.....	13
Luminex analyseprincip.....	15
Materialer og metode	17
Indsamling af prøvemateriale	17
Serologisk respons materialer.....	17
Mucosalt slimhinde respons materialer	18
Serologisk respons metode.....	19
Direkte assay	20
Neutraliseringsassay	21
Databehandling.....	23
Kvalitetssikring	23
Mucosalt slimhinde respons metode.....	24
Prøvemateriale.....	24
Kobling af perler	24
Luminex assay	26
Fastsettelse af cut-off grænse.....	27
Kvalitetssikring	27
Resultater	28
Serologisk respons	28
Mucosalt slimhinde respons	35
Serologisk versus mucosalt slimhinde respons.....	36
Diskussion.....	37
Serologisk respons	37
Mucosalt slimhinde respons	39
Serologisk versus mucosalt slimhinde respons.....	40
Perspektivering	41

Konklusion.....	42
Referenceliste	43
Bilagsfortegnelse.....	46
Bilag 1: Tabel med fordeling af alder og køn	46
Bilag 2: Kruskal-Wallis og Mann-Whitney test af det serologiske respons personale	46
Bilag 3: Kruskal-Wallis Mann-Whitney test af det serologiske respons patienter.....	49
Bilag 4: Kruskal-Wallis test af det serologisk personale sammenlignet med patienter.....	53
Bilag 5: Wilcoxon test af IgG (mucosalt slimhinde respons).....	57
Bilag 6: Wilcoxon test af IgA (mucosalt slimhinde respons)	57
Bilag 7: Wilcoxon test af IgM (mucosalt slimhinde respons)	58
Bilag 8: Korrelationstest Spearman Rank IgG (serologisk versus mucosalt slimhinde respons).....	58
Bilag 9: Korrelationstest Spearman Rank IgA (serologisk versus mucosalt slimhinde respons).....	58
Bilag 10: Korrelationstest Spearman Rank IgM (serologisk versus mucosalt slimhinde respons).....	59

Introduktion

I følgende afsnit præsenteres projektets problembaggrund og tilhørende problemformulering ligeledes beskrives teori og analyseprincipper til anvendt apparatur og metoder.

Problembaggrund

Alvorlig akut respiratorisk syndrom coronavirus 2 (SARS-CoV-2) er det syvende kendte medlem i coronavirus familien og forårsager coronavirus sygdommen (COVID-19). Denne coronavirus er ansvarlig for den verdensomspændende pandemi, som siden dens fremkomst i december 2019 har haft massive konsekvenser for folkesundheden og økonomien verden over. I skrivende stund er 172.630.637 individer globalt blevet bekræftet COVID-19 positive hvoraf 3.718.683 er anslået døde med forbindelse til COVID-19 (1).

SARS-CoV-2 virussen spredes mellem mennesker på forskellige måder, det kan være gennem dråbesmitte og kontaktsmitte. Hovedsageligt spredes virussen ved tæt kontakt mellem mennesker hvis man inhalerer aerosoler eller dråber indeholdende virussen eller hvis virussen kommer direkte i kontakt med øjne og øvre luftveje (2).

I luftvejene kan virus trænge ind i epitelcellerne, da disse celler har en celleindgangsreceptor der muliggør, at virus kan invadere kroppens celler og formere sig herinde. Dette er nødvendigt for viral overlevelse, da virus herefter kan spredes til kroppens andre celler. Samtidigt vil immunforsvaret forsøge at bekæmpe denne nye coronavirus. Det innate immunforsvar opdager først den indtrængende virus, men hvis det ikke lykkes at genkende og bekæmpe virussen med innate faktorer, begynder det adaptive immunforsvar at etablere sig og bekæmpe virussen med både cellulære og humorale respons. Udfordringen med det adaptive immunforsvar er, at det tager lang tid, op til 7-14 dage, at etablere det første basale respons, hvis der ikke er hukommelsesceller fra et tidligere møde med samme patogen. Dette problem har vi med en ny type virus som SARS-CoV-2 er. Aktivering af det adaptive immunforsvar indebærer modning af T-celler og B-celler, hvor sidstnævnte resulterer i produktion af SARS-CoV-2 specifikke antistoffer der omfatter klasserne IgG, IgM og IgA (3).

Inkubationstiden for COVID-19 er variabel på omkring 3-14 dage med en mediantid på 5-7 dage (4). Efter inkubationstiden vil der kunne udvikles symptomer, men COVID-19 sygdomssværhedsgraden er meget varierende. Nogle COVID-19 tilfælde er asymptomatiske mens andre oplever influenzalignende symptomer og i kritiske tilfælde vil der være behov for hospitalsindlæggelse og mekanisk ventilation. Ældre svækkede, kroniske syge og svært overvægtige kan opleve en sygdomsudvikling der er livstruende, derfor er disse mennesker i højrisikogruppen for at udvikle alvorlig COVID-19. Derudover betragter Sundhedsstyrelsen gravide kvinder og deres ufødte barn som en risikogruppe ved infektion med SARS-CoV-2, men der er fortsat uklarhed om infektion under graviditet reelt udgør en risiko (5,6).

Virusudbruddet ramte Danmark for fuld styrke i marts måned 2020, men i modsætning til mange andre lande er det lykkedes at undgå et sammenbrud i sundhedsvæsenet som følge af manglende ressourcer til behandling af patienter. Dette skyldes en række omfattende tiltag for at mindske smittespredningen. Der er et presserende behov for at forstå coronavirus biologien og varigheden af immunitet mod SARS-CoV-2-infektion, da epidemiologiske modeller og foranstaltninger for

folkesundheden antager at vi opnår en vis grad af immunitet ved SARS-CoV-2 rekonvalescens og dermed er med til at forme tiltagene (3,7–9).

Medicinalindustrien og forskere verden over har arbejdet i døgndrift på at udvikle en effektiv COVID-19-vaccine, hvilket er i høj prioritet, da det kan vise sig at være starten på slutningen af pandemien ved at mindske både sygdomstilfælde og smittespredning. Vaccinen har til formål at styrke kroppens forsvar mod SARS-CoV-2-infektion. Dette gøres blandt andet ved at danne antistoffer mod SARS-CoV-2, således der opnås immunitet over for virussen, hvilket både forebygger sygdom hos det enkelte individ men også generelt smitte i samfundet (10).

Det serologiske IgM og IgG-antistofniveau formodes at være af fremtrædende karakter ved SARS-CoV-2-infektion og COVID-19-vaccination, dog vides det ikke hvordan det mucosale respons er. Det dominerende antistof i slimhindernes immunsystem er IgA, som blandt andet findes i spyt, hvilket kan benyttes som prøvemateriale til at undersøge om Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinen giver et IgA-respons. På denne måde kan det ses om det fulde mucosale respons opnås hos COVID-19-naive individer eller kun hos tidligere inficerede individer.

Problemformulering

Hvordan er det serologiske og mucosale slimhinde antistofrespons hos COVID-19 Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinerede individer?

Delformuleringer

For at undersøge det serologiske respons hos BNT162b2 vaccinerede individer, analyseres 1460 sundhedspersonale og 1110 patienter i to forskellige ELISA-baserede assays. Der analyseres prøver fra dag 0, og uge 3 (cirka 21 dage) efter 1. vaccination. Der måles på SARS-CoV-2 specifikke antistoffer og subklassificering af isotyper samt virusneutraliseringsniveau. Der undersøges om hvorvidt der ses en forskel i respons hos hospitalsansatte og patienter hvilket gøres med en Kruskal-Wallis test. Derudover laves den selvsamme statistiske test for at undersøge om alder og køn har indflydelse på responset i de to grupper. Dette udføres med statistikprogrammet Prism 9 (GraphPad, USA).

For at undersøge slimhinderesponsen hos BNT162b2 vaccinerede individer, analyseres spyt fra 108 patienter både 3 uger efter første vaccination og 2 måneder efter første vaccination - dette vil sige efter anden vaccination. Her måles på SARS-CoV-2 specifikke antistoffer overfor det receptorbindende domæne (RBD), hvorefter der laves en parret nonparametrisk t-test (Wilcoxon test) med statistikprogrammet Prism 9 (GraphPad, USA).

Der laves en komparativ analyse mellem det serologiske og mucosale respons hos 70 COVID-19 vaccinerede patienter, som har afgivet både serum og spyt. Der sammenlignes antistofniveauer i de forskellige platforme for IgG, IgA og IgM ved hjælp af Spearman Rank korrelationstest med Prism 9 (GraphPad, USA).

Teori

I følgende afsnit beskrives basal baggrundsviden til forståelse for resten af projektets resultater og diskussion.

Det adaptive immunforsvar

Det adaptive immunforsvar spiller en stor rolle ved SARS-CoV-2 infektion og elimineringen af virus. Denne del af immunforsvaret består af B- og T-celler. Der findes både T-hjælper celler samt cytotoxiske T-celler (11).

De cytotoxiske T-celler kan via deres T-celle receptor genkende fremmede molekyler fra infektionen der er præsenteret på værtscellens overflade, og derefter dræbe den inficerede celle ved at udskille molekyler, der starter apoptose i den inficerede celle. T-hjælperceller har ikke sammen funktion, da deres primære funktion er at aktivere andre celler fra immunforsvaret.

B-cellernes vigtigste funktion er at udskille antistoffer, dette sker efter ved møde antigen sammen med stimulering (receptor og cytokiner) fra T-hjælper-celler, hvor de vil aktiveres, affinitetsmodnes, lave isoklasse skift og uddifferentieres til henholdsvis hukommelsesceller og plasmaceller, der producerer antistoffer.

Plasmacellerne vil danne specifikke antistoffer rettet mod mikroorganismen, og disse vil derefter kunne bidrage til yderligere aktivering af forskellige grene af immunsystemet. Derudover vil antistofferne kunne binde sig direkte til virus og neutralisere dennes infektionsevne. Virussen kan herefter ikke trænge ind i værtsceller og vil ikke kunne formere sig. Ved infektion med SARS-CoV-2 er det vigtigt, at der dannes specifikke antistoffer til bekæmpelse af virus.

I forbindelse med det primære immunologiske respons, vil der også dannes hukommelsesceller; T-celler og B-celler. Disse celler vil være i kroppen i årevis efter infektion og vil kunne aktivere og reagere ved en re-infektion, og på denne måde vil der være et større og hurtigere respons i tilfælde af re-infektion. Det er denne mekanisme man udnytter ved vaccination, da man er interesseret i at opnå varig immunitet baseret på hukommelsesceller mod en sygdom, uden at påføre selve sygdommen.

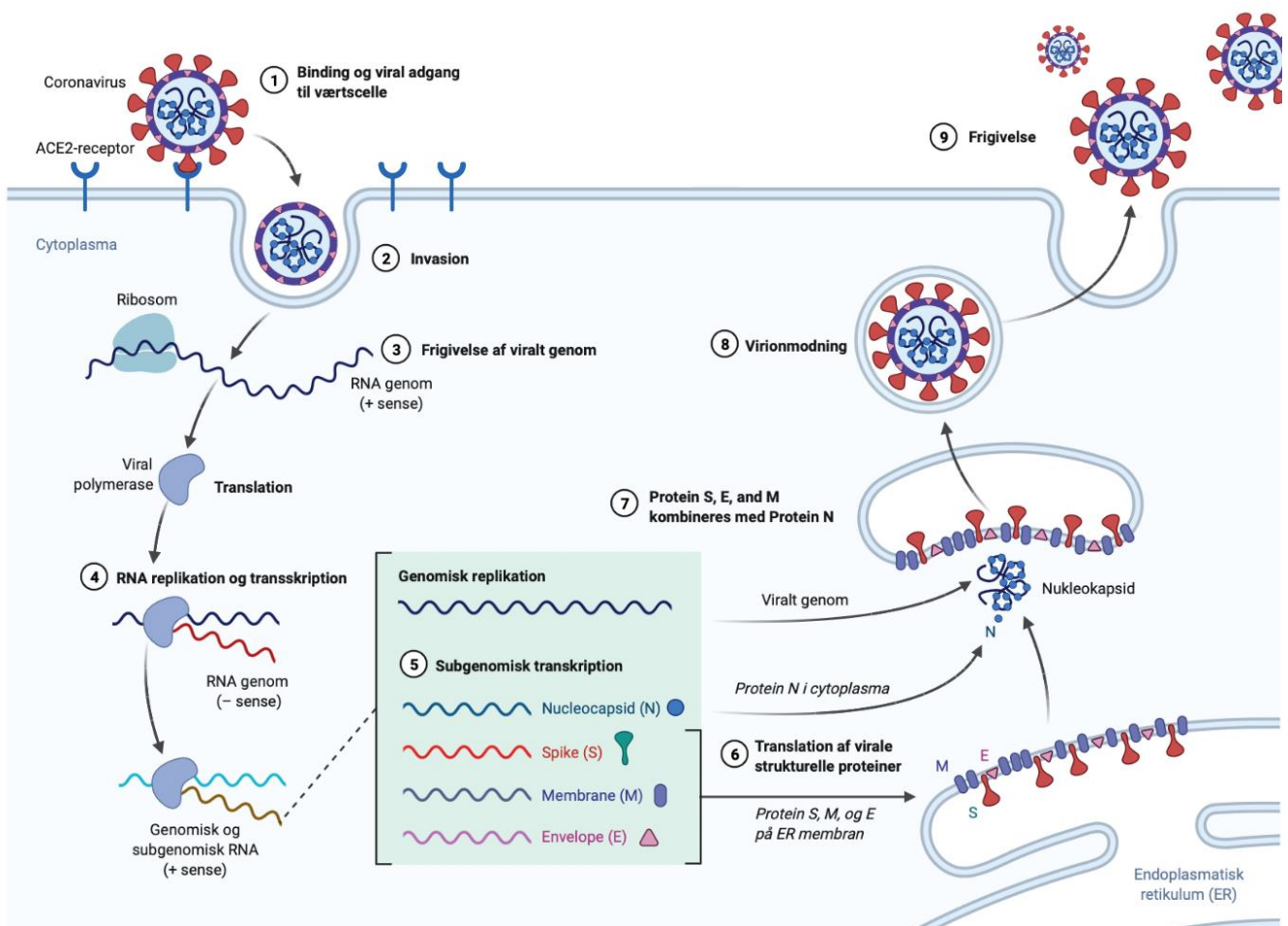
Virusreplikation

Virus består af genetisk materiale omgivet af en protein-kappe, som har til formål at beskytte genomet, samt hægte sig fast på andre værtsceller og trænge ind i de (12). Virus er en "parasit" der ikke kan formere sig selvstændigt, hvilket er en af grundene til, at den invaderer kroppens celler. Syntese af både nukleotider, ribonukleotider og protein kan ikke ske uden hjælp fra en levende værtscelle. Dette gør ofte virus vanskelig at behandle, da mange typer medicin også vil ramme kroppens egne cellulære processer. Vira's replikative cyklus er afhængig af art og virus kategori, men der er seks grundlæggende trin.

1. **Adsorption:** virus bindes til værtscelle ved hjælp af proteiner på protein-kappen og værtscellens specifikke overfladereceptorer.
2. **Invasion:** binding til værtscellen inducerer konformationsændringer i kapsid-proteiner som resulterer i en fusion af virale og cellulære membraner. Virus kan herefter injicere genomet i værtscellen.
3. **Frigørelse af genom:** kappe-proteinet nedbrydes af enzymer, som frigiver det virale genom.
4. **Replikering:** transkription eller translation af virusgenomet initieres.
5. **Samling og modning:** de virale proteiner pakkes med nyt replikeret genom i viruspartikler kaldet virioner og gøres klar til frigivelse fra værtscelle.

6. **Virionfrigivelse:** Viral frigivelse kan foregå på to måder: lysis eller budding. Lysis resulterer i død af den inficerede værtselle og budding frigiver den indhyllede virus uden at dræbe værtsellen.

I forbindelse med SARS-CoV-2 vil det foregå således, at den første binding til værtsellen initieres af interaktion mellem S-proteinets receptor bindende domæne (RBD) og værtscellens overfladereceptor angiotensinreceptor 2 (ACE-2) (13). Denne interaktion er nøgelfaktoren for at SARS-CoV-2 kan inficere en værtselle. Herefter skal virusen have adgang til værtscellens cytosol, hvilket opnås ved en fusion af de virale og cellulære membraner. Dette resulterer i frigivelse af virusgenomet i værtscellens cytoplasma. Herefter følges de grundlæggende trin i virusreplikationen. Efter replikering, translateres de strukturelle proteiner S, E og M og senere bliver det virale genom indkapslet af N-protein hvorved der efterfølgende dannes modne virioner og frigives. Dette illustreres forsimplet på figur 1.



Figur 1: Forsimpleret udgave af coronavirusreplikation. Det ses at virus bindes til værtselle hvorefter der sker en invasion således genomet kan replikeres. Efterfølgende samles virionen og frigives fra værtsellen.

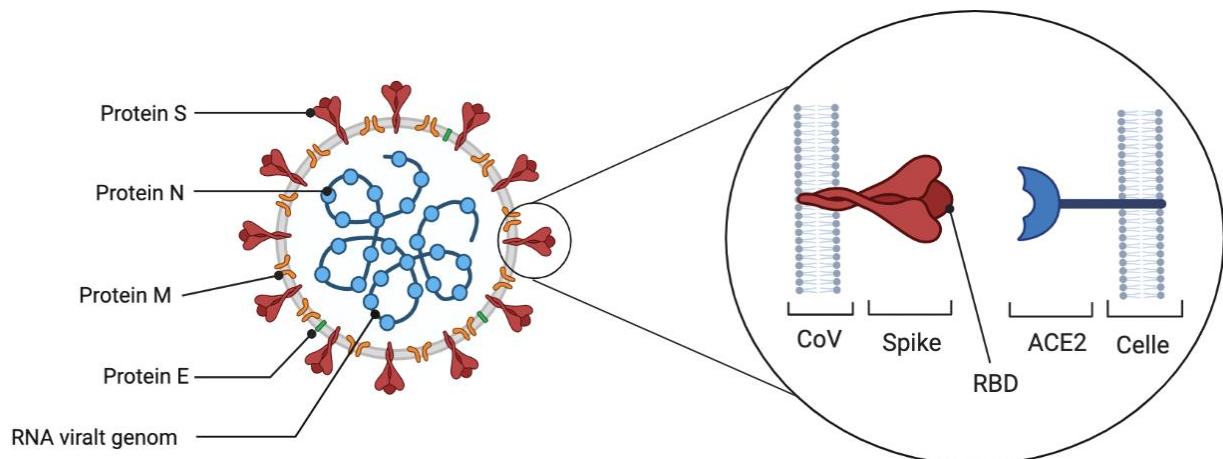
Det vides endnu ikke om virionerne bruger den traditionelle udgang fra værtsellen, men i andre coronavira, transporteres ubrugt S-protein til celleoverfladen og medierer celle-cellefusion mellem inficerede celler og tilstødende ikke-inficerede celler.

SARS-CoV-2 virusstruktur

Tidligt i COVID-19 pandemien viste bioinformatiske analyser, at SARS-CoV-2-virusen er beslægtet med coronavirusfamilien. Denne nye virus adskiller sig dog fra tidligere SARS-CoV, men det samlede genom har omtrent 80% sekvenshomologi på tværs af virusfamilien (14).

SARS-CoV-2 er en indkapslet RNA-virus med en diameter på 61-125 nm som indeholder genomet sammensat af ca. 30.000 nukleotider. Af disse nukleotider koder en tredjedel for fire strukturelle proteiner: spike-protein (protein S), membranprotein (protein M), kappeprotein (protein E) og nucleocapsid-protein (protein N).

På figur 2 kan det ses, at protein S beklæder den ydre virale lipidmembran, hvor dets receptorbindende domæne (RBD) medierer interaktion med værtscellens overfladereceptor ACE-2. S-proteinet er derfor en nøglefaktor, da proteinet medierer receptorgenkendelse, cellebinding og fusion for virusinfektion. En blokering af denne binding ville forhindre at virusen kan binde sig til værtscellen. Dette kan ske ved virusneutralisering, hvor eksempelvis specifikke SARS-CoV-2 antistoffer rettet mod RBD eller protein S binder sig til overfladeproteinet og dermed blokerer bindingen (8,14–16).



Figur 2: Forsimpleret udgave af bindingen mellem værtscelle og SARS-CoV-2 virus. Det ses, at protein S er lokaliseret på den ydre lipidmembran hvor RBD medierer interaktion med overfladereceptoren ACE-2 på værtscellen.

M-proteinet i membranen menes at give virionens form, hvor E-proteinerne menes at være et transmembranprotein. N-proteinet er det eneste protein der er til stede i nukleosidkappen, som udgør en beskyttende skal af proteiner der omslutter genomet i en virus, hvilket beskytter virusgenomet fra direkte kontakt med miljøet i værten. En fordel ved N-proteinet i SARS-CoV-2 er, at det er dækket af et ekstra lag af virale proteiner hvoraf spike proteinet er hovedkomponenten i dette lag.

Ved infektion indtrænges N-proteinet i værtscellen med det virale RNA, og hjælper med virusreplikation intracellulært (17,18). Udover dette er nukleokapsid-proteinet et udtrykt viralt protein, derfor vil dette protein forbedre forståelsen af COVID-19 i forbindelse med diagnosticering og behandling af virusen i form af vaccine.

Vaccineudvikling

Udvikling af vacciner er normalt en langsommelig proces, men baseres først og fremmest på grundforskning, hvor der fokuseres på den sygdomsfremkaldende mikroorganisme, dens biologi, forekomst af sygdom og sygdomsrelateret immunologi. Denne grundforskning bestemmer hvilke

antigener, der er mest relevante til at rejse et immunforsvar imod. Herefter kan den prækliniske fase påbegyndes. Dette indebærer at udvikle den potentielle vaccine i laboratorie og eksperimentere på forsøgsdyr for at evaluere dens effektivitet og sikkerhed. Hvis den potentielle vaccine udvikler et effektivt immunrespons uden alvorlige bivirkninger i forsøgsdyrene, påbegyndes kliniske humane forsøg, hvilket inddeles i tre faser (19,20).

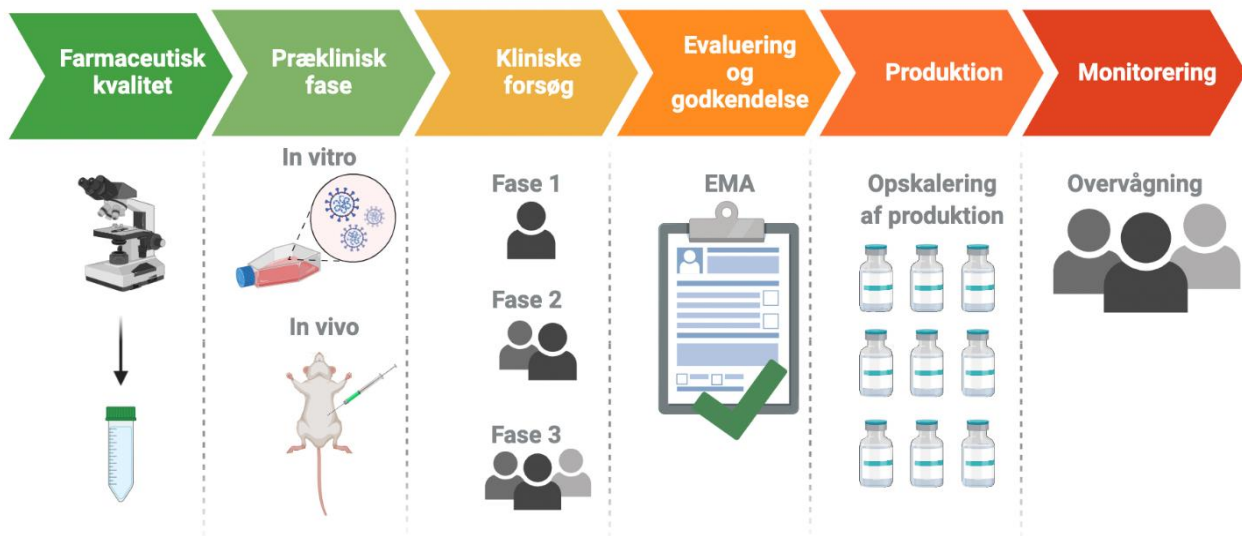
Fase 1 er lille i målestok hvor vaccinen gives til et lille antal frivillige individer der repræsenterer populationen som vaccinen er beregnet til. Denne fase udføres for bekræftelse af sikkerhed hos mennesker samtidigt med at kunne bekræfte at der genereres et immunrespons. Forventede bivirkninger observeres, ligeledes alvorlige bivirkninger, derudover laves undersøgelser for at bestemme den mest effektive dosis.

Hvis resultaterne i fase 1 er lovende, påbegyndes fase 2 hvor vaccinen gives til flere hundrede frivillige. Her vurderes dens sikkerhed og immunogenicitet yderligere. Der er ofte flere forsøg i denne fase, da der evalueres på forskellige aldersgrupper.

Vurderes vaccinen som sikker og der udløses en immunreaktion, påbegyndes vaccinstudiet i stor målestok. Her vil antallet af forsøgspersoner variere fra nogle hundrede individer til titusinder af individer i den relevante målgruppe. Frivillige deltagere kan bo på tværs af lande og flere steder i et land, hvilket sikrer at vaccinen gælder for mange forskellige populationer.

I fase 3 undersøges raske individer og særligt sårbare individer, ideelt set hvor hastigheden for viral transmission er høj. Inden vaccination deles de frivillige op; den ene halvdel får tildelt vaccinen og den anden modtager en placebo - en såkaldt kontrolgruppe (randomiseret trial). På denne måde afgøres om vaccinen er effektiv mod sygdommen, og som i de tidligere faser observeres bivirkninger. Hvis uventede alvorlige bivirkninger forekommer, gennemgås relevante oplysninger for at beslutte om det kliniske forsøg skal genstartes og eventuelt tilbageholdes.

Når resultaterne fra de kliniske forsøg er tilgængelige, indsendes en ansøgning til godkendelse af relevante kontrolmyndigheder. I EU underkastes en vaccine en videnskabelig vurdering af Det Europæiske Lægemiddelagentur (EMA), for at evaluere om vaccinen er sikker og effektiv på tværs af en bred population og derefter besluttet det om vaccinen indføres i et vaccinationsprogram. Yderligere overvågning over vaccins effektivitet, sikkerhed og indvirkning finder sted løbende efter vaccinen er godkendt og indført til brug. Alt dette er opsummeret på figur 3 hvor der ses et forsimplet overblik over vaccineudviklingen.



Figur 3: Overblik over vaccineudvikling. Det ses at udviklingen inddeles grundforskning, præklinisk fase og klinisk forsøg som inddeles i tre faser. Når en effektiv og sikker vaccine er udviklet, indsendes ansøgning om godkendelse til kontrolmyndigheder og hvis vaccinen godkendes, indføres et vaccinationsprogram og der sker opskalering af produktionen. Yderligere overvågning finder sted efter vaccinen er i brug.

Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccine

I Danmark blev Pfizer/BioNTech COVID-19 BNT162B2 vaccinen godkendt til brug af EU i slutningen af december 2020, hvor de første vacciner blev givet til danske borgere (10,21).

Vaccinen er udviklet på en ny metode, hvor mRNA-sekvensen der koder for protein S, benyttes som immunogen. For at kroppen kan optage mRNA-sekvensen, er den omgivet af et lipidlag der medfører, at mRNA kan fusionere med cellemembraner. Herefter kan vaccinen optages i cytosolen og translateres til protein S. Dette vil resultere i, at kroppens immunforsvar aktiveres og responderer ved at genkende protein S som fremmed, hvorefter der udvikles og modnes T- og B-lymfocytter. Disse B-celler begynder derefter at producere specifikke antistoffer mod protein S og dermed mod det dominerende SARS-CoV-2 overfladeantigen (22,23).

Vaccinen gives i to doser for at sikre fuld effekt. Anden dosis giver et boost til immunforsvaret og gives 3-6 uger efter første vaccination. Efter fuld vaccination, vil immunsystemet kunne genkende virussen og eventuelt neutralisere den, hvis en vaccineret person kommer i kontakt med SARS-CoV-2. Undersøgelser viser at Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinen giver en 95% beskyttelse mod at blive smittet med COVID-19 (21).

ELISA analyseprincip

ELISA er en forkortelse af enzymlinket immunosorbent assay, som er en pladebaseret teknik der kan bruges til detektion af proteiner og antistoffer (24). I denne teknik bruges polystyren Maxisorb-plader til at immobilisere, og dermed binde et antistof eller antigen på pladeoverfladen.

Det immobiliserede antistof bruges til binding af det protein der ønskes detekteret. Denne binding kan i sig selv ikke detekteres, da bindingen ikke kan ses eller måles uden yderligere reagenser, hvilket er grunden til at der bruges et visualiseringssystem. Visualiseringssystemet indeholder et enzym der kan reagere med substratet, således der sker en farvareaktion. De specifikke antistoffer

er i dette tilfælde konjugeret med enzymet HRP, som kan bindes til TMB ONE og derefter mediere en målbar farverevaktion.

Udover et enzymkonjugeret antistof kan der bruges et biotin-streptavidin kompleks. Det er baseret på, at biotin konjugeres til et antigen eller antistof, hvorefter biotin kan binde til streptavidin-HRP og på denne måde vil enzymet kunne reagere med substratet. Alle uspecifikke bindinger vaskes væk, hvilket resulterer i, at der kun er en specifik mængde antistof bundet i hver brønd alt efter koncentrationen af analytten. Signalstyrrelsen vil derfor være proportional med koncentration af analytten.

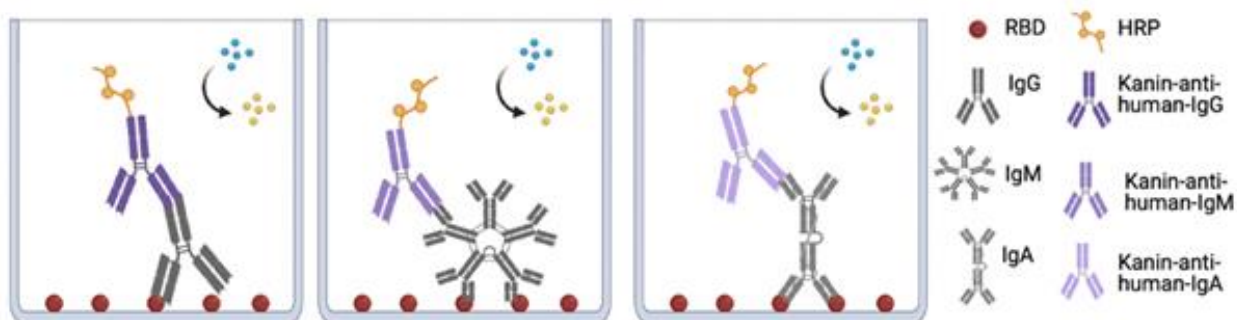
Farverevaktionen udvikles over tid, derfor stoppes reaktionerne ved et specifikt tidspunkt for at undgå falsk forhøjede værdier. Signalstyrken måles via en absorptionslæser, og kan efterfølgende bruges til enten at vurdere tilstedeværelse eller en specifik koncentration af analytten.

Til dette forsøg er brugt to forskellige ELISA assays; et direkte assay og et neutraliseringsassay, hvor principperne illustreres på figur 4 og 5.

I det direkte ELISA-assay immobiliseres RBD på polystyrenpladen. Ved tilsætning af serum fra personale og patienter fra Rigshospitalet, vil specifikke SARS-CoV-2 antistoffer kunne binde sig til det immobiliserede RBD.

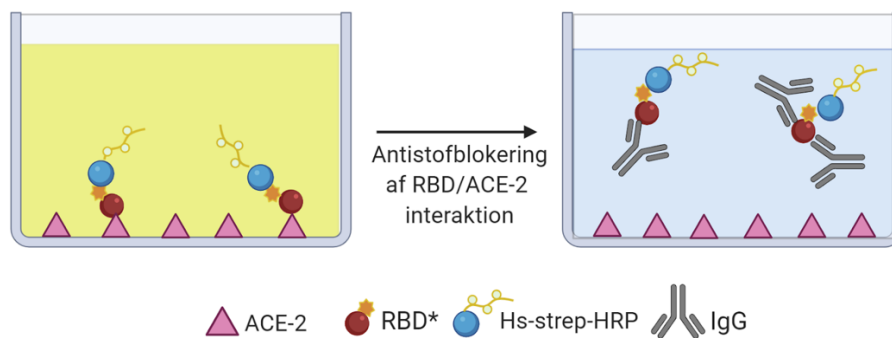
Efter dette bindingstrin vil detektionsantistoffer (kanin-anti-human IgG, IgM eller IgA) binde sig direkte til de specifikke antistoffer. Detektionsantistofferne er konjugeret med enzymet HRP. Ved detektionen tilsættes substratet TMB ONE, og HRP-enzymet vil herefter mediere en farverevaktion. Ved tilsætning af stopreagens (H₂SO₄) skifter farven i brøndene fra blå til gul og pladerne aflæses ved en bølglængde på 450 nm.

Ved dette forsøg ses en høj OD-værdi ved prøver indeholdende mange antistoffer, og en lav OD-værdi ved prøver indeholdende få eller ingen antistoffer.



Figur 4: Skitseret overblik af den direkte ELISA. De grå antistoffer stammer fra patientserum, og de forskellige nuancer af lilla illustrerer HRP-polyklonale kanin-antistoffer rettet mod IgG, IgM og IgA. Brøndene er coatet med RBD, hvor SARS-CoV-2 antistoffer fra patientserum bundet. Der ses derudover den direkte binding mellem kanin-anti-humanantistofferne og SARS-CoV-2 antistofferne. Brøndene vil efter tilsætning af substrat udvikle blå farve, som efter tilsætning af stopreagens vil skifte til gul.

I neutraliseringsassayet immobiliseres ACE-2 på polystyrenplader. Dette assay kaldes også et inhibitions assay, da fravær af signal fra bunden RBD er et resultat af antistofneutralisering. Som det ses på figur 5, indikerer signalet mængden af bundet RBD, og ikke mængden af specifikke antistoffer fra individernes serum.



Figur 5: Overblik over neutraliseringsassay. Til venstre ses reaktionen når der ikke er SARS-CoV-2 antistoffer tilstede, og RBD vil binde sig til ACE-2 hvilket resultere i en farvereaktion. Til højre ses reaktionen ved tilstedeværelse af SARS-CoV-2 antistoffer. Her er antistofferne bundet til RBD, hvilket forhindrer dennes binding til ACE-2, og der er derfor ingen farvereaktion.

Individernes serum blandes med biotinyleret RBD samt HS-strep-HRP, og inkuberes sammen inden det tilsættes på pladen. I dette trin vil de SARS-CoV-2 specifikke antistoffer fra serum kunne bindes til RBD-Strep komplekset, så antistofferne på denne måde kan neutralisere RBD inden det interagerer med ACE-2. På pladen vil det biotilylerede RBD og HS-Strep-HRP fungerer som et detektionsantistof, og farvereaktionen udvikles med TMB ONE. Ved dette forsøg vil der være en høj OD-værdi ved prøver med lav neutraliseringsgrad, og en lav OD-værdi ved høj neutraliseringsgrad, da antistofferne i dette tilfælde vil have hæmmet RBD-bindingen.

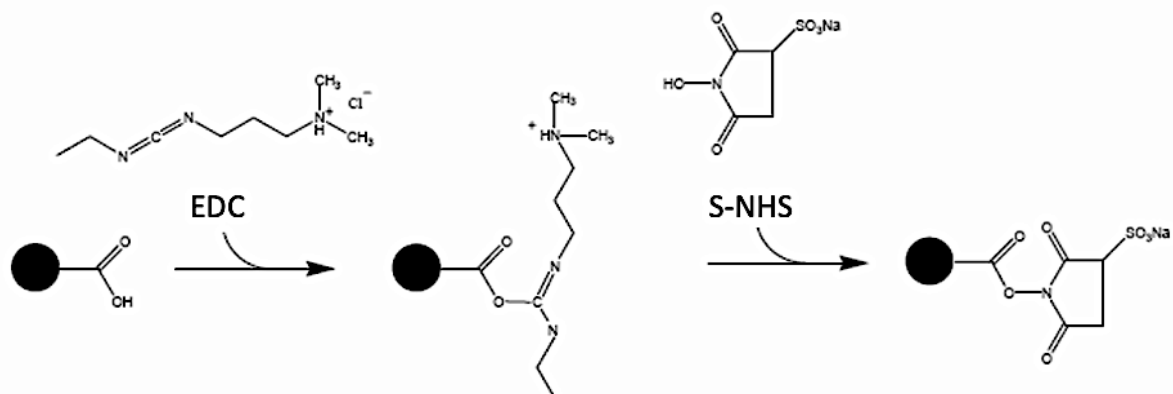
Luminex analyseprincip

Luminex muliggør analyse af flere komponenter i én enkelt brønd. Dette gøres ved en flowbaseret multipleks analysemetoder kaldet Luminex xMap, hvor der anvendes farvekodede mikrosfærer i form af perler. Disse perler har en magnetisk kerne og er 6.5µm i størrelsen ligeledes har de en rød og infrarød fluorofor, som giver perlerne en unik spektral signatur. Grundet mange forskellige proportioner af fluoroforer resulterer det i 100 unikke spektrale regioner, som identificeres af Luminex-instrumentet.

Inden brug af perlerne i en analyse skal de kobles til proteiner (target-proteiner), hvilket sker ved en kemisk binding hvor antistoffer fastgøres til perleoverfladen ved en kovalent binding mellem perlernes carboxylgruppe (-COOH) og antistoffets aminer (NH₂).

Når perlerne aktiveres, skal de først vaskes for at fjerne opbevaringsopløsningen og antimikrobielle stoffer. Herefter tilsættes 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] (EDC) som aktiverer carboxylgrupper til reaktion med amin-grupper, hvilket gøres ved at danne et ustabil mellemprodukt. (25)

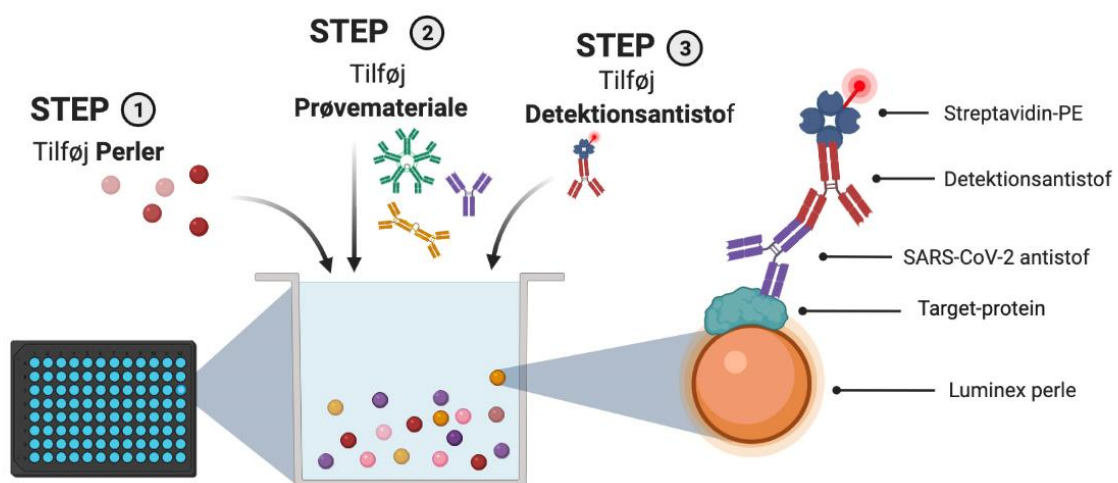
Herefter tilsættes N-hydrosulfosuccinimide (S-NHS), som konverterer aktiverede carboxylgrupper til konjugering med aminer (NH₂) hvorefter der skabes en semi-stabil amin-reaktiv NHS-ester. Denne kemiske kobling af perler illustreres på figur 6 (25,26).



Figur 6: Kemiisk kobling af perler. Den sorte perle repræsenterer en -COOH magnetisk perle som benyttes i projektet. Det ses, at dens carboxylgruppe (-COOH) bindes med EDC og der dannes et mellemprodukt. Ved tilsættelse af sulfo-NHS bindes carboxylgrupperne med amingruppen fra det anvendte antistof hvorefter der dannes en kovalent binding.

Ikke reageret S-NHS og EDC fjernes ved vask, hvilket skal forhindre aktivering af carboxylgrupper i proteinet. Herefter inkuberes de aktiverede perler med target-protein i to timer, hvor frie aminer på protein-sidekæderne interagerer med mellemproduktet for at danne en kovalent binding med perlerne. Efter inkuberingen fjernes overskydende ubundet protein hvorefter PBS+1%BSA tilsættes, for at blokere ureagerede grupper på perlerne.

De farvekodede perler konjureret til proteiner, inkuberes med prøvemateriale; ukendte prøver, standarder med en kendt antistofkoncentration og kontroller. I den første inkubation bindes prøvematerialet til de perle-bundne-proteiner. Efter vask tilsættes detektionsantistoffer, som er mærket med streptavidin-phycoerythrin (PE). Under anden inkubation genkender de forskellige detektionsantistoffer specifikt henholdsvis IgG, IgA og IgM og bindes hertil. Efter vask er overskydende PE-streptavidin-konjurerede detektionsantistof fjernet, og denne tre-lag-sandwich resuspenderes i buffer, og aflæses ved hjælp af Luminex-instrumentet. Et overordnet flowdiagram for Luminex-fremgangsmetoden illustreres i figur 7.



Figur 7: Skitseret flowdiagram over Luminex-proceduren. Step 1: Prøven tilsættes en blanding af farvekodede perler der er præ-coatet med target protein (RBD, rHSA eller Protein N). Step 2: Prøvemateriale indeholdende IgG, IgA og IgM-antistoffer tilsættes. Step 3: PE-konjureret antistofspecifikke detektionsantistoffer (ged-anti-human IgG, IgA, IgM) tilsættes.

Luminex-analysatoren er designet med en flowcytometerdel hvor detektionsmetoden er dobbelt-laser flow-baseret. Dette betyder at en 635nm diode-laser kan detektere røde og infrarøde fluoroforer, hvor en laser registrer og klassificerer perlen, og en anden laser bestemmer størrelsen af det PE-afledte signal, hvilket er proportionalt med mængden af bundet analyt. Instrumentet består ligeledes af en XY-plattform, hvor prøvemateriale opsuges og indføres i flowcytometer-delen hvor enkelte perler detekteres.

For at sikre en robust detektion foretages flere aflæsninger i hvert perle-område, da der for hver perle-type aflæses minimum 50 events. Softwaren beregner en middelværdi for den pågældende analyts koncentration hvilket medfører, at der ikke behøves en dobbeltbestemmelse (27,28).

Materialer og metode

I følgende afsnit beskrives hvilke metodologiske og etiske overvejelser der er gjort forud for projektet ligeledes præsenteres anvendt materiale og apparatur.

Indsamling af prøvemateriale

I projektet anvendes prøvemateriale fra BNT162b2 vaccinerede patienter og sundhedspersonale som er godkendt til brug af De Videnskabsetiske Komiteer for Region Hovedstaden med godkendelsesnummer H-20028627.

Alle forsøgsparticipanter har modtaget information, både skriftligt og mundtligt, hvortil der foreligger skriftligt samtykke til brugen af materialet i COVID-19 forskningssammenhæng. Projektet udføres i overensstemmelse med Helsinki-II-deklarationen (29).

Fuldblodsprøver fra venepunktur blev indsamlet i 3.5 ml serum rør med koagulationsaktivator fra Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinerede patienter og sundhedspersonale, hvoraf nogle patienter afgav spytp prøve i Oracol rør.

Serumprøver og spytp prøver blev indsamlet på Rigshospitalet (Infektionsmedicinsk afdeling og Kardiologisk afdeling) og Herlev Hospital (Kardiologisk afdeling). Alt prøvemateriale blev ved analyserne anonymiseret og tildelt et internt prøvenummer. Efterfølgende blev blodprøver og spytp prøver koblet sammen ved hjælp af CPR-nummer og den registrerede analysekode.

Serologisk respons materialer

I nedenstående tabel 1 er alle anvendte reagenser angivet. Derudover er der anvendt negative og positive kontroller, hvor de negative kontroller tidligere er testet negative for SARS-CoV-2 specifikke antistoffer. Positive kontroller er ligeledes anvendt som kalibratorer, og består af en blanding af serumprøver fra smittede individer der er testet PCR-positive for COVID-19, med høje antistofniveauer og høj neutralisering.

Materiale og reagenser	Producent	LOT-nummer
PBS-buffer, pH 7.4	Apoteket, Region HB	864485
Tween 20	Merck Millipore	8.22184.0500
96-well conical Btm PP Plt natural RNASE/DNA-Free	Thermo Fisher Scientific	1301844
TMB ONE	Kementec	200301
Svovlsyre H2SO4	Kementec	200503U
Nunc Maxisorb 96-brøndsplader	Thermo Fisher Scientific	116654
ACE-2 1.3 mg/mL	Fremstillet internt	
High Sensitivity-streptavidin-HRP	Thermo Fisher Scientific	VK3130665
Biotinylet RBD	Fremstillet internt	
Nunc Maxisorb 384-brøndsplader	Thermo Fisher Scientific	164532
EDTA	SIGMA-ALDRICH	BCVB1557
Skim Milk Powder	SIGMA-ALDRICH	BCCD5290
RBD 2.21 mg/mL	Fremstillet internt	
Kanin-anti-human IgG- HRP	DAKO	P0214
Kanin-anti-human IgM- HRP	DAKO	P0215
Kanin-anti-human IgA- HRP	DAKO	P0216

Tabel 1: Oversigt over alle anvendte materialer samt producent, reference- og LOT-nummer. Materialer og reagenser der er fælles for begge assays ses i den gule sektion, materialer og reagenser for det neutraliserende assay ses i den blå sektion, og materialer og reagenser for det direkte assay ses i den grønne sektion.

I nedenstående tabel 2 er anvendt apparatur og producent angivet.

Apparatur	Producent
Biomek FX Automated WorkstationV	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Synergy HT Absorbance Reader	Bio-Tek, Winooski, VT, USA

Tabel 2: Oversigt over anvendte apparatur og deres producent.

Mucosalt slimhinde respons materialer

I nedenstående tabel 3 er alle anvendte reagenser angivet. Derudover er der anvendt negativ kontrol og IgG, IgA og IgM standardprøver. Den negative kontrol og standardprøverne er en pool af SARS-CoV-2 negative individer som ikke er BNT162b2-vaccineret.

Materiale og reagenser	Producent	LOT-nummer
Oracol Saliva Collection Device	Malvern Medical Developments	S14
Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads 37	BIO-RAD	B79181
Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads 54	BIO-RAD	B81528
Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads 65	BIO-RAD	B74916
Pierce Premium-Grade EDC	Thermo Scientific	UJ290183
Pierce Premium-Grade Sulfo-NHS	Thermo Scientific	UJ289575
PBS-buffer, pH 7.4	Apoteket, Region H	864485
Sodium Azide	SIGMA-ALDRICH	STBG9569
Bovine Serum Albumin Fraction V	SIGMA-ALDRICH	51391225
96-well conical Btm PP Plt natural RNASE/DNA-Free	Thermo Fisher Scientific	1301844
PBS-buffer, pH 7.4	Apoteket, Region H	864485
Bovine Serum Albumin Fraction V	SIGMA-ALDRICH	51391225
Skim Milk Powder	SIGMA-ALDRICH	BCCD5290
Bio-Plex Pro Flat Botom Plates	BIO-RAD	171025001
Goat Anti Human IgG:RPE	BIO-RAD	156993
Goat Anti Human IgA:RPE	BIO-RAD	151214
Goat Anti Human IgM:RPE	BIO-RAD	154644
Bio-Plex Calibration Kit (CAL1 & CAL2)	BIO-RAD	64387570
Bio-Plex Sheat Fluid	BIO-RAD	64375881

Tabel 3: Oversigt over alle anvendte materialer samt producent og LOT-nummer. Materialer og reagenser til indsamling vises i den røde sektion, kobling af perler vises i den gule sektion, reagenser og materialer til selve analysedelen vises i den blå sektion og materialer og reagenser til aflæsning vises i den grønne sektion.

I nedenstående tabel 4 er alt anvendt apparatur og producent angivet.

Apparatur	Producent
Micro Star 17R centrifuge	VWR
Branson 200 Ultrasonic Cleaner	Branson Ultrasonics
DynaMag-2	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Rotamix INTELLI-mixer RM-2	ELMI
Bio-Plex Handheld Magnetic Washer	BIO-RAD
Luminex 100	R&D Systems

Tabel 4: Oversigt over anvendte apparatur og producent. Apparatur til klargøring af prøvemateriale vises i den røde sektion, kobling af perler i den gule sektion, instrument til selve analysedelen vises i den blå sektion og apparatur til aflæsning vises i den grønne sektion.

Serologisk respons metode

Undersøgelse af det serologiske respons består af to forskellige typer ELISA assays; et direkte assay hvor der måles på subclasserne af SARS-CoV-2 antistoffer samt et neutraliseringsassay hvor der måles på antistoffers neutraliseringspotentialer.

I hvert assay blev der målt på to serumprøver fra hvert individ; en prøve taget på dag 0 inden første vaccine samt en serumprøve cirka 21 dage efter første vaccination.

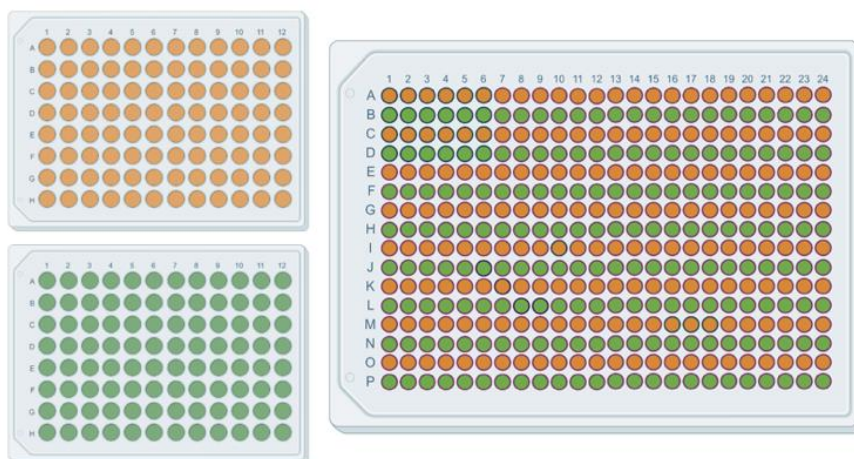
Til begge assays bruges samme vaskebuffer, denne er fremstillet inden brug og består af PBS samt 0.05% Tween.

Direkte assay

Dette forsøg blev lavet i 384-brøndsplader (Thermo Scientific, Danmark). Serumfortyndinger blev forberedt i 96-brøndsfortyndningsplader (Thermo Scientific, Danmark).

Til start blev reagensen til coating klargjort ved at lave en fortynding af RBD på 1 µg/ml i PBS. Derefter blev 25 µl af det fortyndede RBD tilsat i hver brønd på 3 sæt Nunc Maxisorb 384-brøndsplader; ét sæt til hver antistofisotype (IgG, IgM og IgA), efterfulgt af inkubation ved 4°C natten over.

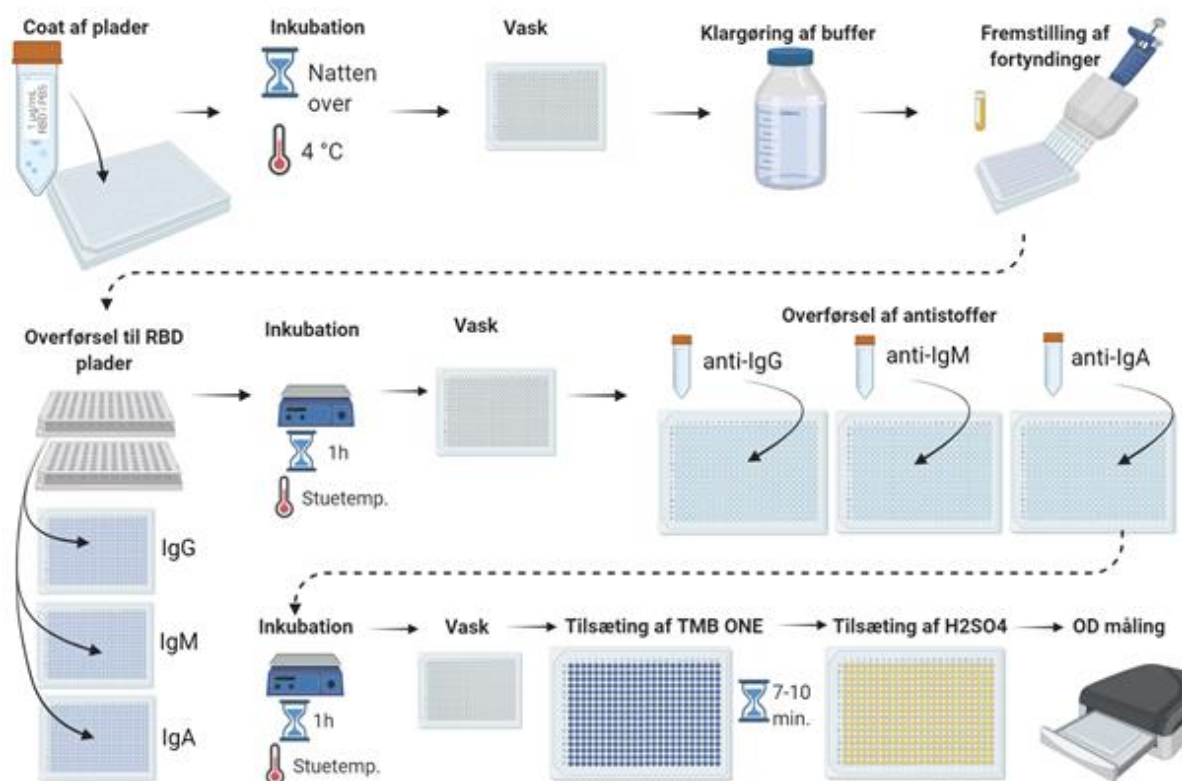
Inden pladerne blev anvendt, blev de vasket 4 gange med PBS-T buffer, hvor bufferen fra den sidste vask efterlades i brøndene imens prøverne blev klargjort. Dernæst blev buffer indeholdende PBS, 0.05% Tween, 5mM EDTA og 5% skummetmælkspulver (SIGMA ALDRICH, USA) klargjort. Buffer blev tilføjet i brøndene på 96-brønds-ikke-absorberende plader. Serumprøverne blev fortyndet i en 3-folds fortynding med en startkoncentration på 1:400. Derudover blev der også fremstillet en 2-folds fortyndinger af positiv og negativ kontrol med en startkoncentration på 1:200. Til overførsel af fortyndinger til 384-brønde blev Biomek FX Automated Workstation (Beckman Coulter, USA) anvendt. I 384-brøndene var der plads til to fortyndingsplader med dobbeltbestemmelse, hvilket er illustreret på figur 8.



Figur 8: Oversigt over plade set-up ved det direkte assay. Til venstre ses de to 96-brøndsplader, til højre ses 384-brøndspladen efter de to fortyndingsplader er tilsat. Farverne på brøndene illustrerer placeringen på 384-plade.

Efter overførsel blev pladerne inkuberet ved stuetemperatur på pladeryster i 1 time. Efter endt inkubation blev pladerne vasket 4 gange med PBS-T. Dernæst fortyndes HRP-konjugerede polyklonale kanin-anti-human-antistoffer; IgG, IgM og IgA (DAKO, Danmark) med PBS-T i en koncentration på 0,5 µg/ml. Af de fortyndede antistoffer blev 25µl tilsat i hver brønd på pladerne, hvorefter der blev inkuberet ved stuetemperatur på pladeryster i 1 time.

Efter endt inkubation blev pladerne vasket 4 gange med PBS-T efterfulgt af fremkaldelse med 25µl af substratet TMB ONE (Kementec, Danmark). Reaktionen blev stoppet med 25µl H₂SO₄ 0.2M (Kementec, Danmark) efter henholdsvis 7 minutter (IgG) og 10 minutter (IgM og IgA). OD måles på alle plader ved 450nm under anvendelse af Synergy HT Absorbance Reader (Bio-Tek, USA). Workflow for dette forsøg er illustreret på figur 9.



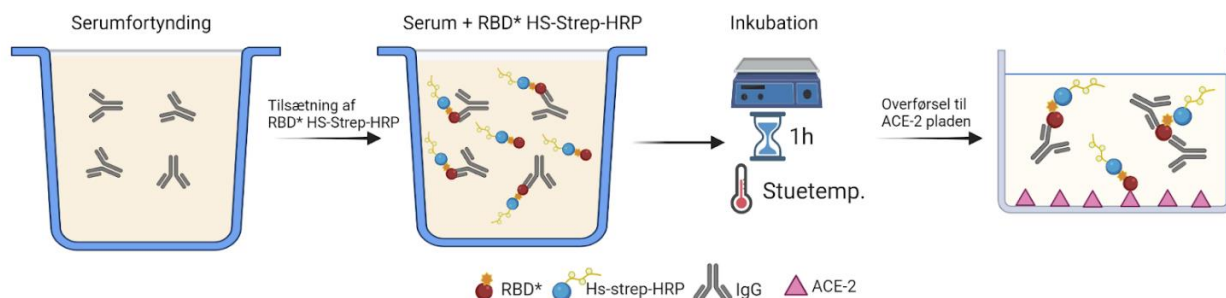
Figur 9: Workflow for det direkte assay. Pladerne coates med RBD, hvorefter de inkuberes natten over. Efter inkubation vaskes pladerne, og bufferen klargøres. Plasmafortyndingerne fremstilles, og vil derefter blive overført til RBD pladerne. Efter inkubation og vask overføres detektionsantistoffer, hvorefter pladerne igen inkuberes. Efter endt inkubation vaskes pladerne, og der tilsættes substrat efterfulgt af stopreagens. Til sidst læses pladerne ved en OD måling.

Neutraliseringsassay

Til dette forsøg bruges 96-brøndsplader (Thermo Scientific, Danmark). Disse 96-brøndsplader blev coatet med 1µg/ml ACE-2 i PBS (100 µl/brønd) og inkuberet ved 4°C natten over.

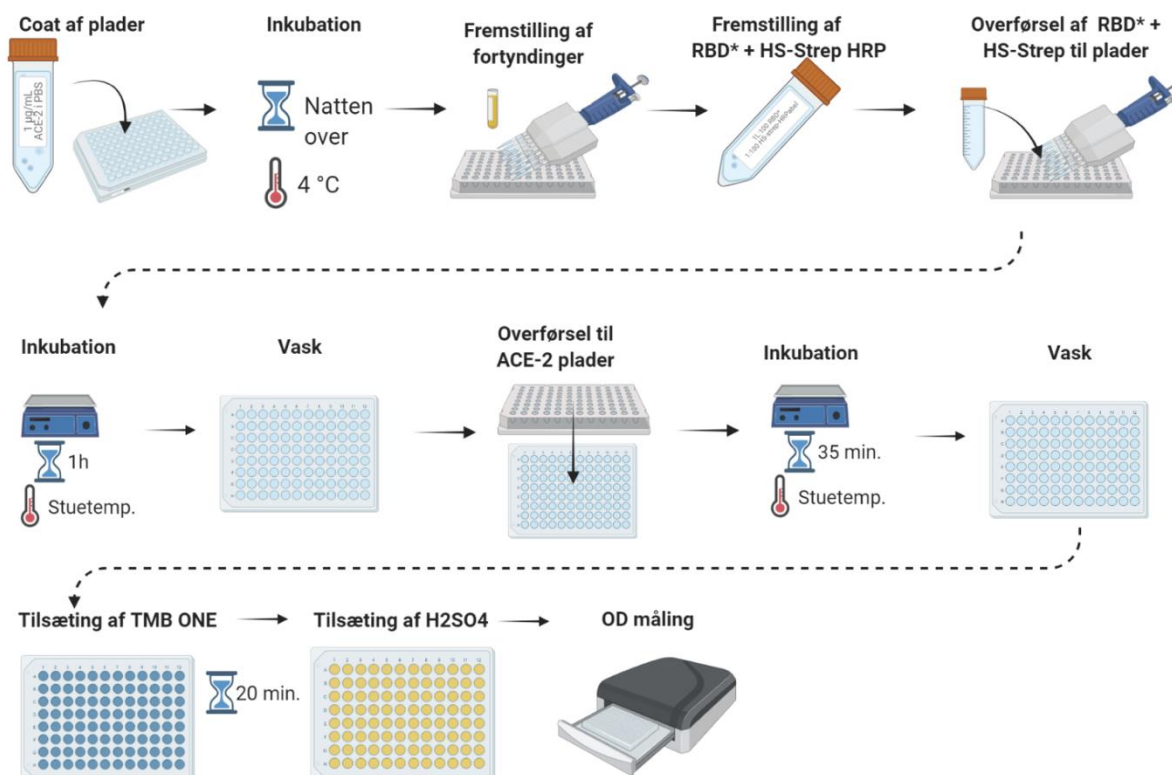
Serumfortyndinger blev fremstillet med med en startkoncentration på 40% i PBS-T i 96-brønds-ikke-absorberende plader (Thermo Scientific, Danmark), hvorefter fortyndingen fortsatte i 4-punkts 3-folds fortynding med et slutvolumen på 60µl. Derudover blev en præ-fortynding af biotinyleret RBD og HS-Strep-HRP (Thermo Scientific, Danmark) klargjort med forholdet 1:100 i PBS-T buffer. Herefter blev 60µl af præ-fortyndingen tilsat i hver brønd, således koncentrationen af serum, RBD og HS-Strep-HRP halveres. Dernæst blev pladerne inkuberet 1 time på pladeryster ved stuetemperatur. Under inkubationen blev de ACE-2 coatede plader vasket 3 gange i PBS-T, hvor bufferen fra sidste vask efterlades i brøndene indtil pladerne, blev taget i brug.

Af serumblandingen fra fortyndingspladerne blev 100µl tilsat til ACE-2 pladerne efterfulgt af 35 minutters inkubation på pladeryster ved stuetemperatur. Blanding af præ-fortynding og overførsel til ACE-2 pladen er illustreret på figur 10.



Figur 10: Blanding af præfortynding og overførsel til ACE-2 coatet plade. Serumfortynding indeholdende SARS-CoV-2 antistoffer fremstilles i fortyndingsplader. Derefter tilsættes RBD*+HS-Strep-HRP, som vil binde sig til antistofferne. Efter inkubation tilsættes blandingen til ACE-2 pladen, hvor overskydende RBD* vil binde sig til ACE-2.

Efter endt inkubation blev pladerne vasket 3 gange med PBS-T efterfulgt af fremkaldelse, hvor der blev tilsat 100 µl TMB ONE (Kementec, Danmark) substrat i hver brønd. Reaktionen blev stoppet med 0.2 M H₂SO₄ (Kementec, Danmark) efter 20 minutters inkubation i mørke. Til sidst måles OD på alle plader ved 450 nm, ved anvendelse af Synergy HT Absorbance Reader. Workflow for dette forsøg er illustreret på figur 11.



Figur 11: Workflow for det neutraliserende assay. Pladerne coats med ACE-2, hvorefter de inkuberes natten over. Efter inkubation vaskes pladerne. Serumfortyndingerne fremstilles, derefter fremstilles RBD-HS-Strep-HRP-blanding. Blanding tilsættes pladerne, og de inkuberes herefter. Efter inkubation overføres pladerne til ACE-2 pladerne, og disse inkuberes. Efter endt inkubation vaskes pladerne, og der tilsættes substrat efterfulgt af stopreagens. Til sidst læses pladerne ved en OD måling.

Databehandling

Niveauerne af de specifikke SARS-CoV-2 antistoffer blev målt på i alt 2570 personer, heraf blev en 0 dages prøve og en prøve indsamlet 3 uger efter Pfizer/BioNTech BNT162B2 vaccinationen. Ud af de 2570 individer er 1460 personale på Rigshospitalet og 1110 er patienter fordelt på forskellige afdelinger på Rigshospitalet. Patienter og personale er yderligere delt op efter alder og køn for at sammenligne disse parametre, fordelingen med antal ses på bilag 1.

Der blev målt antistofniveauer for IgG, IgM og IgA mod RBD i det direkte assay, hvor resultatet er angivet ved en optical density værdi. Disse OD-værdier interpoleres for senere at kunne sammenligne dem, hvilket gøres ved at lave en lineær regressionsanalyse ud fra titreringsværdierne af den positive kontrol. De forskellige OD-værdier fra prøvematerialet fortyndinger sammenholdes med regressionskurven, hvorefter der udvælges den fortynding der passer bedst på den lineære del, så sammenhængen mellem OD-værdi og arbitrary units kan findes.

Da koncentrationen af RBD-antistofferne er ukendt i den positive kontrol, kendes den absolutte koncentration af de tre antistofisotyper i prøvematerialet heller ikke. Derfor bruges arbitrary units (AU/ml) i relation til kontrollen.

Neutraliseringspotentialer af SARS-CoV-2 antistoffer blev målt på samme gruppe af individer som i det direkte assay. Her fremstår rådata også som OD-værdier, som omregnes til et neutraliseringsindex. Til dette bruges OD-værdien for den negative kontrol, samt OD-værdien fra 10% serumfortynding fra et individ. Herefter udregnes hvor mange procent af signalet fra serumfortyndingen der udgør af signalet fra den negative kontrol, som fratrækkes af 100% for at angive mængden af neutralisering.

For at kunne skelne mellem de individer der har været smittet med SARS-CoV-2 og de individer der ikke har, opdeles disse to grupper yderligere i naive og præ-immuniserede individer. Dette gøres ved at bruge testresultater fra Rigshospitalets Biokemiske afdeling, hvor alle deltagende individer er testet for tilstedeværelse af protein-N. Da vaccinen indeholder mRNA for RBD, og ikke protein-N vil de individer der er positive for protein-N have mødt virussen i dens naturlige form, og har derfor tidligere været smittet. Fra personalegruppen er 108 individer testet positive for protein-N, og 53 individer fra patientgruppen er testet positive for protein-N.

Kvalitetssikring

For at opnå god kvalitet under hele analysen og dermed have valide data, har der været fokus på kvalitetssikring. Inden de to ELISA assays blev taget i brug, blev der gennemgået en optimeringsproces hvor temperatur, inkubationstider og koncentration af reagenser er undersøgt. Alle reagenser har været opbevaret korrekt, og der er kontrolleret holdbarhedsdato. Inden brug af reagenser samt blodprøver, er disse blevet blandet ved brug af vortex mixer. Ved blanding af buffer og fortynding af reagenser er disse fremstillet lige inden brug, da nogle reagenser er lysfølsomme.

Da der kun er interesse i at undersøge specifikke bindinger ved ELISA, har der været stor fokus på at undgå uspecifikke bindinger. Dette er gjort ved at sikre en god vaskeprocedure, hvor alle brønde fyldes og tømmes omhyggeligt enten 3 eller 4 gange alt efter formatet. Derudover er der brugt

Tween-20 i vaskebufferen som vil blokere uspecifikke bindinger, da molekylet også kan binde sig til polysteren overfladen.

For at opnå optimal inkubation er der benyttet sealer til pladerne for at undgå fordampning og udslip af reagenser, samt der er brugt pladeryster for at alle reaktanter er blandet og for at mediere antigen-antistof bindingen.

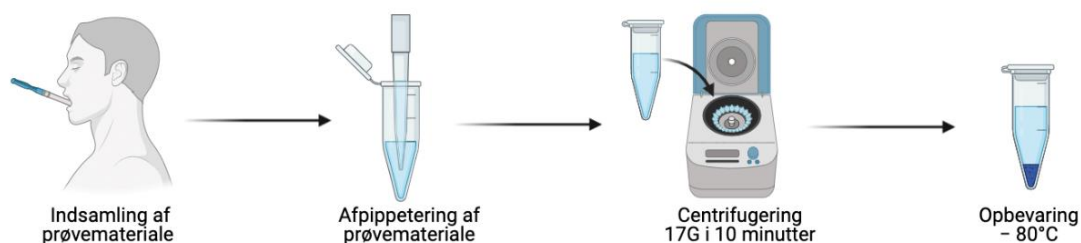
Ved fremkaldelse af plader bruges TMB ONE, og da dette reagens er lysfølsomt, vil pladerne under inkubation være mørklagt. Pladerne pakkes ind i sølvpapir herefter for at den endelige farvereaktion ikke ændres af lyset.

Mucosalt slimhinde respons metode

Projektet for det mucosale respons indebærer præsentation af prøvematerialets klargørelse, kobling af perler og metoden for Luminex-analysen.

Prøvemateriale

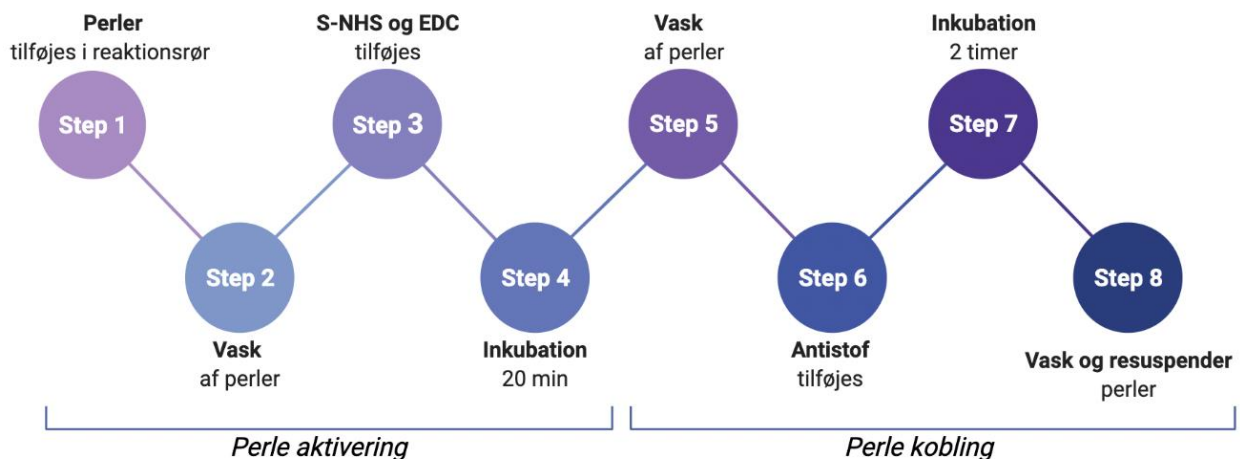
I Oracol-rør (Malvern Medical Developments, Storbritannien) indsamles spyt fra patienter tilknyttet Herlev Hospital og Rigshospitalet. Prøvematerialerne modtages på Forskningsenheden hvor spyt afpipetteres i mærkede eppendorfrør efterfulgt af centrifugering i Micro Star centrifuge (VWR, Belgien) i 10 minutter ved 17G hvorefter det opbevares ved -80°C grader. Dette illustreres på figur 12.



Figur 12: Workflow for modtagelse og behandling af prøvemateriale. Spyt indsamles hvorefter det afpipetteres i eppendorfrør efterfulgt af centrifugering. Hvis prøvematerialet ikke analyseres med det samme, nedfryses det ved -80°C grader.

Kobling af perler

Luminex er en perle-baseret teknologi hvilket kræver koblede perler til et ønsket protein. Denne procedure blev udført ved perler koblet til RBD, Protein N og rekombinant humant serum albumin (rHSA). Vaccinen er rettet mod RBD hvilket er grunden til at RBD anvendes. Protein N er medtaget for at undersøge om nogle inkluderede patienter i projektet tidligere har været smittet med SARS-CoV-2, da det medfører at patienten er præ-immuniseret. Rekombinant HSA medbringes for at kontrollere der ikke sker uspecifikke bindinger i analyse. Et overordnet workflow for perle-kobling er illustreret i figur 13.



Figur 13: Workflow over kobling af perler til Luminex assay. Til aktivering vaskes perlerne og tilføjes S-NHS og EDC efterfulgt af inkubation. Dernæst kobles perlerne til antistof og inkuberes i 2 timer, med efterfølgende vask og resuspendering.

Til start blev Bio-Plex COOH-perler (BIO-RAD, USA) blandet i 30 sekunder ved medium hastighed efterfulgt af ultralydsbehandling i ultralydskar (Branson Ultrasonics, USA) i 15 sekunder. Til koblingsreaktionen blev 100µl perler med PBS+1%BSA+0.05%NaN₃ tilsat i et reaktionsrør, som blev placeret i en magnetisk separator (Thermo Fisher Scientific, USA) i 30 sekunder. Efter adskillelse af perler og supernatant, blev væsken fjernet uden at forstyrre perlerne. Reaktionsrøret blev fjernet fra magnetseparatoren hvor der blev resuspenderet med 100µl PBS efterfulgt af 30 sekunders blanding. Reaktionsrøret blev placeret i magnetisk separator i 30 sekunder hvorefter supernatant blev fjernet efterfulgt af at reaktionsrøret blev fjernet fra magneten og perlerne blev resuspenderet i 80µl PBS efterfulgt af 30 sekunders blanding.

Herefter blev 10µl af 50mg/ml S-NHS (Thermo Scientific, USA) tilføjet og blandet, efterfulgt af tilsættelse og blanding med 10µl af 50mg/ml EDC (Thermo Scientific, USA). Eppendorfrørene indpakkes i staniol og placeres i rotator (ELMI, Letland) i 20 minutter ved stuetemperatur.

Efter inkubationen blev 150µl PBS tilføjet hvorefter de aktiverede perler blev blandet ved høj hastighed i 10 sekunder. Eppendorfrøret placeres i magnetisk separator og efter 30 sekunder blev supernatant fjernet. Dernæst blev proceduren fra tilsættelse af 150µl PBS gentaget hvorefter de aktiverede perler blev resuspenderet i 100µl PBS efterfulgt af blanding ved medium hastighed i 30 sekunder.

Til kobling af RBD, protein N og rHSA blev henholdsvis 6, 12 og 20µg tilsat til de aktiverede perler. Dernæst blev det totale volumen bragt op på 500µl med PBS efterfulgt af blanding og inkubation i 2 timer ved stuetemperatur i rotator.

Reaktionsrøret blev placeret i den magnetiske separator i 30 sekunder efterfulgt af fjernelse af supernatant. Røret blev fjernet fra separatorens og de koblede perler blev resuspenderet med 250µl PBS+1%BSA efterfulgt af blanding ved medium hastighed i 15 sekunder.

De koblede perler blev dækket til med staniol og inkuberet ved stuetemperatur i 30 minutter i rotator. Herefter blev reaktionsrøret placeret i magnetisk separator i 30 sekunder og supernatanten blev fjernet fra perlerne.

Reaktionsrøret blev fjernet fra separatorens og de koblede perler blev resuspenderet i 500µl PBS+1%BSA+0.05%NaN₃ efterfulgt af 20 sekunders blanding. Dernæst blev perler og supernatant adskilt i den magnetiske separator efter 30 sekunder og reaktionsrøret blev fjernet fra separatorens. De koblede perler blev dernæst resuspenderet i 150µl PBS+1%BSA+0.05%NaN₃ og opbevaret på køl (2-8C grader) i mørke.

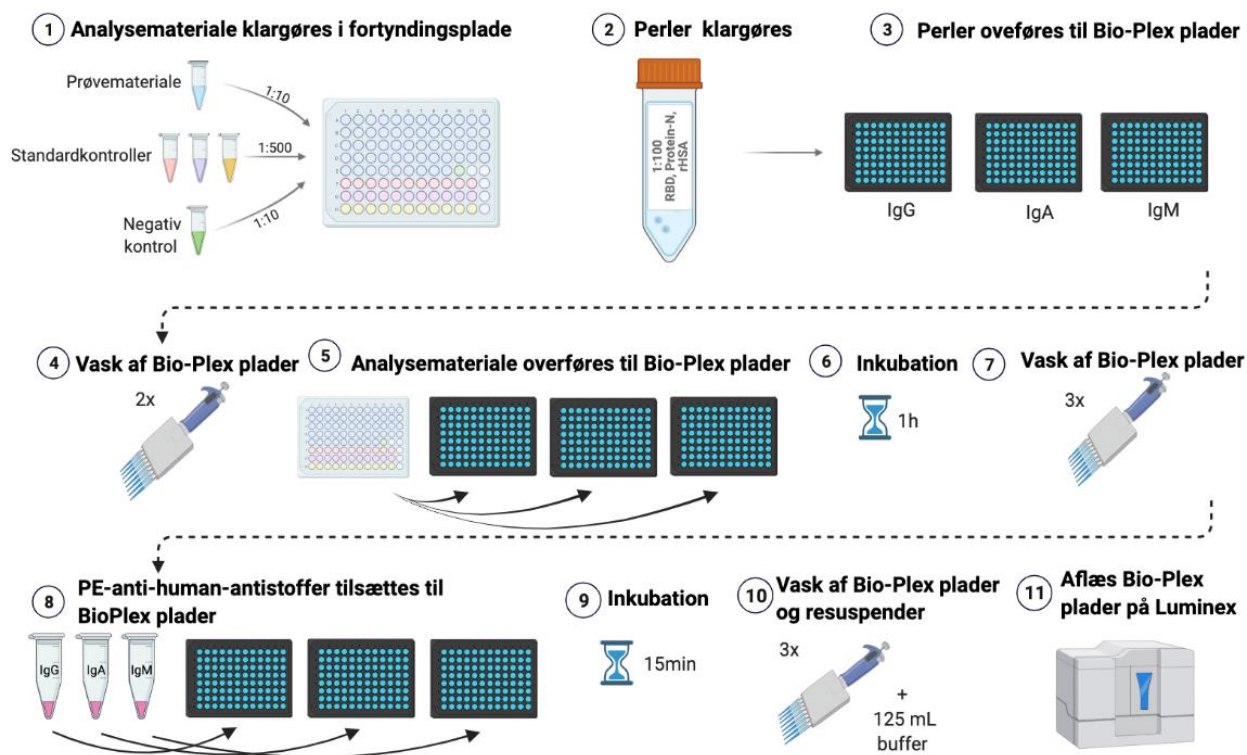
Luminex assay

I ikke-adsorberende fortyndingsplader (Thermo Fisher Scientific, USA) blev prøvemateriale og negativ kontrol tilsat i forholdet 1:10 i stuetempereret buffer bestående af PBS+1%BSA+10%skummetmælkspulver. Standardkontroller for IgG, IgA og IgM blev ligeledes tilsat i ikke-adsorberende fortyndingsplader med forholdet 1:500 i en stuetempereret buffer bestående af PBS+1%BSA som fortyndes 4-fold i 11 fortyndingstrin. Dette blev senere overført til tre forskellige Bio-Plex plader (BIO-RAD, USA), men grundet de lysoverfølsomme perler blev prøvemateriale, kontrol og standardprøver klargjort før klargøring af perlerne.

I Bio-Plex plader blev perler tilsat i forholdet 1:100 efterfulgt af to gang vask med 100µl PBS+1%BSA. Herefter blev prøvemateriale og negativ kontrol overført til tre Bio-Plex plader: IgG, IgA og IgM, med tilhørende standard for den pågældende plade.

Efter 1 times inkubering i mørke ved stuetemperatur på en pladeryster ved 850 RPM blev Bio-Plex pladerne vasket tre gange med PBS+1%BSA hvorefter der blev tilsat PE-anti-human-antistoffer (BIO-RAD, USA) i en koncentration på 2µg/ml.

Efter 15 minutters inkubering i mørke ved stuetemperatur på en pladeryster ved 850 RPM blev Bio-plex pladerne vasket tre gange med PBS+1%BSA hvorefter der blev resuspenderet med 125µl med samme buffer. Herefter blev pladerne dækket til og rystede i minimum 30 sekunder på pladerysteren ved 850 RPM ved stuetemperatur og aflæst på Luminex (R&D Systems, USA) efterfølgende. Fremgangsmåden for Luminex-metoden er illustreret i figur 14, hvor flowdiagrammet giver et overordnet overblik for metoden.



Figur 14: Overordnet flowdiagram over Luminex-metoden. Prøvemateriale, kontroller og standardprøver klargøres i fortyndingsplade. Dernæst klargøres perler som overføres til BioPlex-pladerne, efterfulgt af vask således indholdet fra fortyndingspladerne kan overføres til BioPlex-pladerne. Herefter inkuberes pladerne i 1 time, hvorefter de vaskes således PE-anti-human-antistofferne kan tilsættes efterfulgt af inkubation. Efter endt inkubation vaskes BioPlex-pladerne, og de resuspenderes med buffer i brøndene. Til sidst aflæses pladerne på Luminex instrumentet.

Fastsættelse af cut-off grænse

Der fastsættes en cut-off grænse, hvilket er en afgørende værdi, da den resulterer i at der kan skelnes mellem positive og negative resultater. Denne grænse er fundet ved at analysere 346 spytp prøver fra raske donorer, altså SARS-CoV-2-naive individer, på akkurat samme måde som projektets vaccinerede patienter.

Medianen for antistofniveauerne mod RBD er fundet hvorefter alle værdier under denne median betragtes som negative og gives værdien 1.

Kvalitetssikring

Helt afgørende for projektet er pålidelige analyseresultater, derfor vil der gennem analytisk kvalitetssikring sikres pålidelige og reproducerbare resultater uafhængigt af tid og personale.

Inden Luminex-platformen er taget i brug er der gennemgået et indstillingsforsøg, hvor den rette koncentration af target-protein til kobling af perler er undersøgt.

Der er kontrolleret holdbarhedsdato på alle reagenser, og disse er ligeledes opbevaret korrekt efter leverandørens anbefaling. Inden brug af reagenser, kontroller og prøvemateriale er disse blandet og perlerne er blandet lige inden brug. Perlerne blandes for at adskille dem, og dette gøres inden brug da de er lysfølsomme og ikke er i et mørklagt rør.

Vaskeproceduren har været i fokus, da der kan mistes mange perler hvis det ikke udføres omhyggeligt. Der er sikret en god fiksering af bioplex-pladerne til den håndholdte magnet vasker, således perlerne tiltrækkes magneten og ikke vaskes væk. Derudover er bioplex-pladerne tømt forsigtigt for ikke at slå magneterne ud.

For at opnå en optimal inkubation er der benyttet sealer til bioplex-pladerne for at undgå fordampning og udslip. Ligeledes er der brugt pladeryster for at sikre en blanding af perler og prøvemateriale. Grundet perlernes lysfølsomhed, er bioplex-pladerne mørklagt under inkubation og proceduren hvor pladerne ikke er i brug.

Den gode laboratoriepraksis er sikret ved at medbringe en negativ kontrol på alle Bio-Plex-plader. En inter-assay-variation er pålidelig hvis forskellen er <15% og intra-assay-variation er pålidelig hvis forskellen er <10%. Ligeledes har der været foretaget omkørsel af prøver hvis Luminex har detekteret <50 kugler.

Resultater

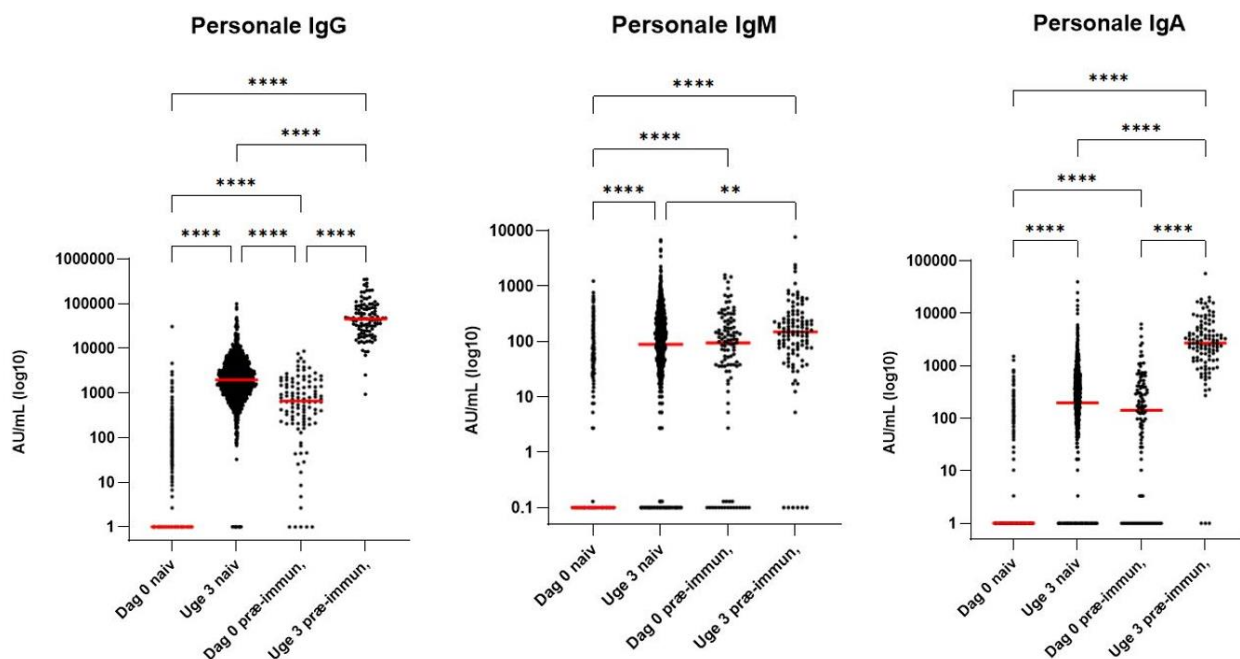
I følgende afsnit præsenteres behandlede resultater fra projekterne i hvert deres afsnit. Til resultater i det serologiske respons benyttes Kruskal-Wallis test med multipel sammenligning og Mann-Whitney test. Til resultaterne i det mucosale slimhinde respons benyttes en Wilcoxon test og til slut kombineres resultaterne med en Spearman Rank korrelationstest.

I figurerne anses P-værdier <0.05 som signifikante, hvor stjernerne på figurerne indikerer signifikansniveauet (*p<0.05, **p<0.01, ***p=0.0005 og ****p<0.0001), hvilket er beregnet ved hjælp af en Wilcoxon test. På figuren angiver ns (no significance) at der ikke er en signifikant forskel. Gennemsnittet for antistofrespons angives med en rød streg.

Serologisk respons

Til sammenligning af den naive og præ-immuniserede gruppe og de tilhørende 0 dage og 3 ugers prøve laves en non-parametrisk ANOVA-test, kaldet Kruskal-Wallis test, med en multiple sammenligning. Ud fra denne test beregnes et signifikansniveau mellem gruppernes deltagere, resultaterne ses på bilag 2,3 og 4.

Antistofniveauerne for personalets prøver ved dag 0 og uge 3 illustreres på figur 15, hvor der ses en højsignifikant forskel mellem de naive og præ-immuniserede individer med et væsentligt højere respons 3 uger efter første vaccine. Medianen ved IgG-responset for de naive individer ved uge 3 er omkring 5000 AU/ml, hvorimod værdien for medianen er omkring 80.000 AU/ml for de præ-immuniserede individer ved uge 3. De præ-immuniserede individers IgG-antistofrespons ligger derfor markant højere end de naive individer. Det samme mønster gør sig gældende for IgM og IgA om end knap så tydeligt for IgM.

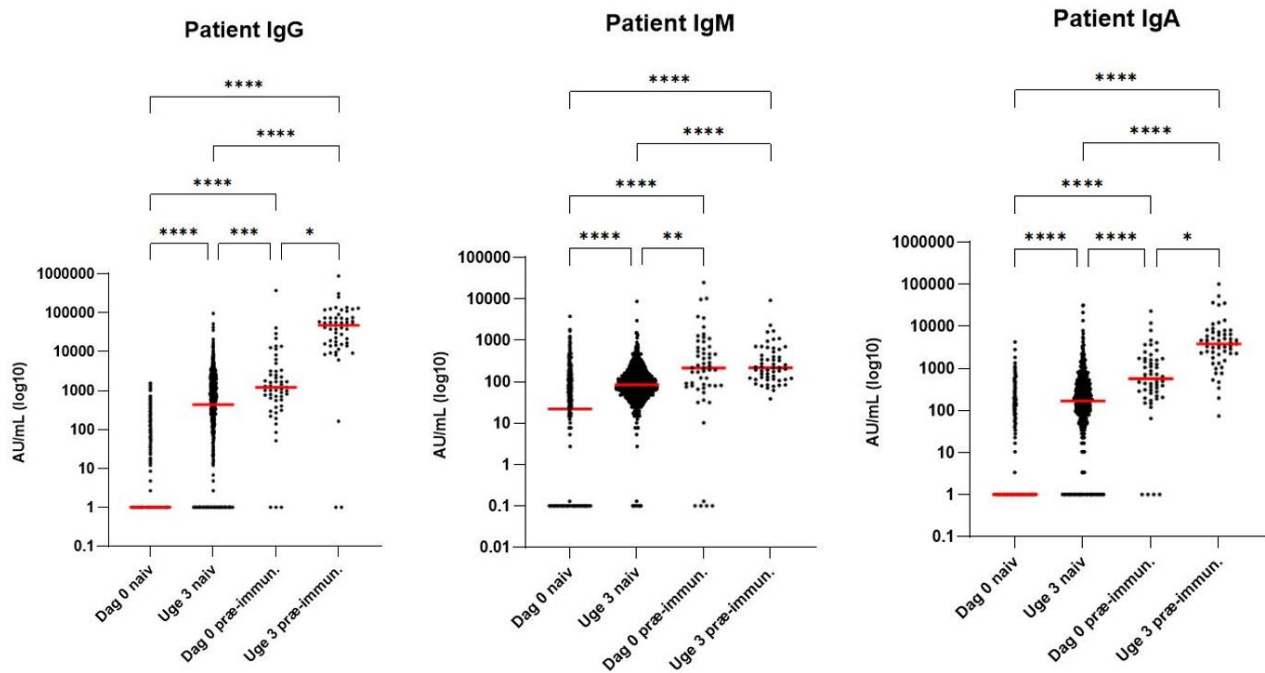


Figur 15: Antistofniveauer fra patienternes 0-dags prøve sammenlignes med antistofniveauerne 3 uger efter første vaccination. Figureerne er opdelt efter isotyperne IgG, IgA og IgM. Data illustreres ved dotplot. På x-aksen ses prøvetidspunktet samt inddeling af individerne i naive og præ-immuniserede, og på y-aksen ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. Stjernerne indikerer signifikans angivet fra en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. **p<0.01 ****p<0.0001.

Sammenligninger med ingen signifikant forskel fremstår ikke på figuren.

Antistofniveauerne for patienternes prøver ved dag 0 og uge 3 illustreres på figur 16, hvor der ses samme tendens som ved personalets antistofrespons. Mellem de naive og præ-immuniserede individer ses en stor signifikant forskel, hvilket gør sig gældende ved dag 0 og uge 3, hvor de præ-immuniserede individers antistofniveau er markant højere end hos de naive individer. Her skal det dog bemærkes, at der ikke er signifikant forskel ved dag 0 og uge 3 prøverne for de præ-immuniserede individers IgM-respons.

Ved sammenligning af de naive individers uge 3 prøve og de præ-immuniserede individers dag 0 prøve ses der en højsignifikant forskel for IgG, IgM og IgA, således at de præ-immuniserede før vaccinen har et højere respons af alle isotyper end naive individer efter første vaccine.

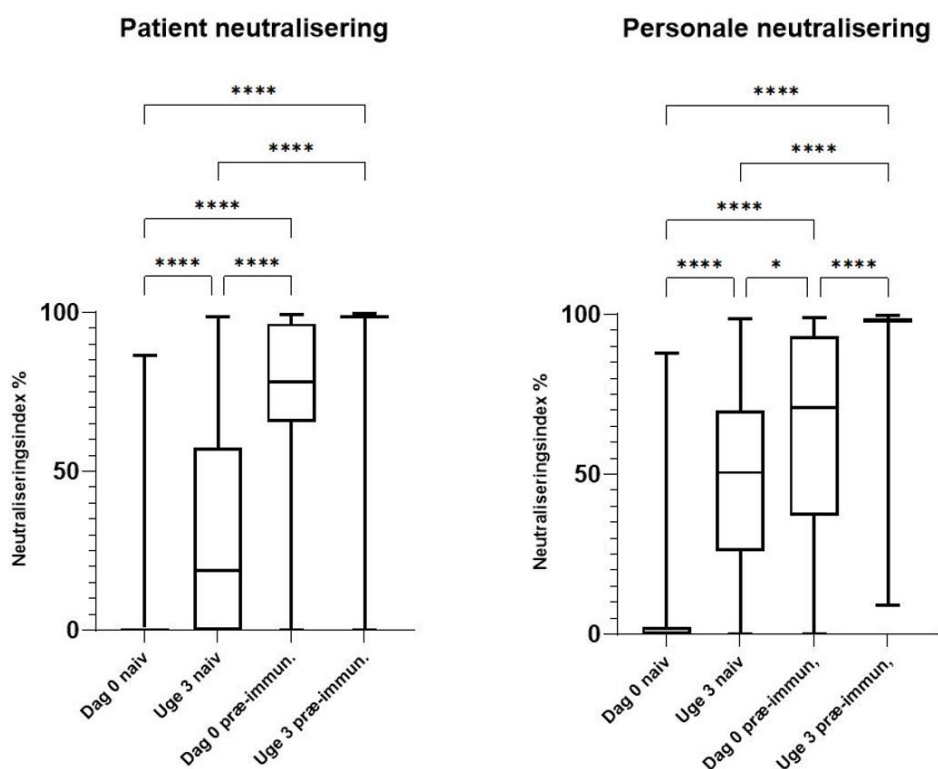


Figur 16: Antistofniveauer fra patienternes 0-dags prøve sammenlignes med antistofniveauerne 3 uger efter første vaccination. Figuren er opdelt efter isotyperne IgG, IgA og IgM. Data illustreres ved dotplot. På x-aksen ses prøvetidspunktet samt inddeling af individerne i naive og præ-immuniserede, og på y-aksen ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log₁₀ skala. Stjerneerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. **p<0.01****p<0.0001. Sammenligninger med ingen signifikant forskel fremstår ikke på figuren

De samme prøver fra patienter og personale blev testet i vores in-house udviklede pseudovirus neutraliseringsassay. Neutraliseringsgraden for dag 0 og uge 3 for patienternes og personalets prøver ses på figur 17, hvor der ses en stor signifikant forskel mellem de naive og præ-immuniserede individer. Den mindst signifikante forskel ses ved personalets uge 3 prøve fra de naive, og personalets dag 0 prøve fra de præ-immuniserede. Det er væsentligt at bemærke, at der ikke er en signifikant forskel mellem de præ-immuniserede patienters dag 0 og uge 3 prøve, men tendensen følger det samme mønster som hos personalet, hvor den statistiske signifikans er tydelig.

Ved sammenligning af de naive individers uge 3 prøve og de præ-immuniserede dag 0 prøve, ses en signifikant forskel hvor præ-immuniserede før vaccinen neutraliserer RBD:ACE-2 interaktionen bedre end både hos virus-naive patienter og personale 3 uger efter første vaccinen.

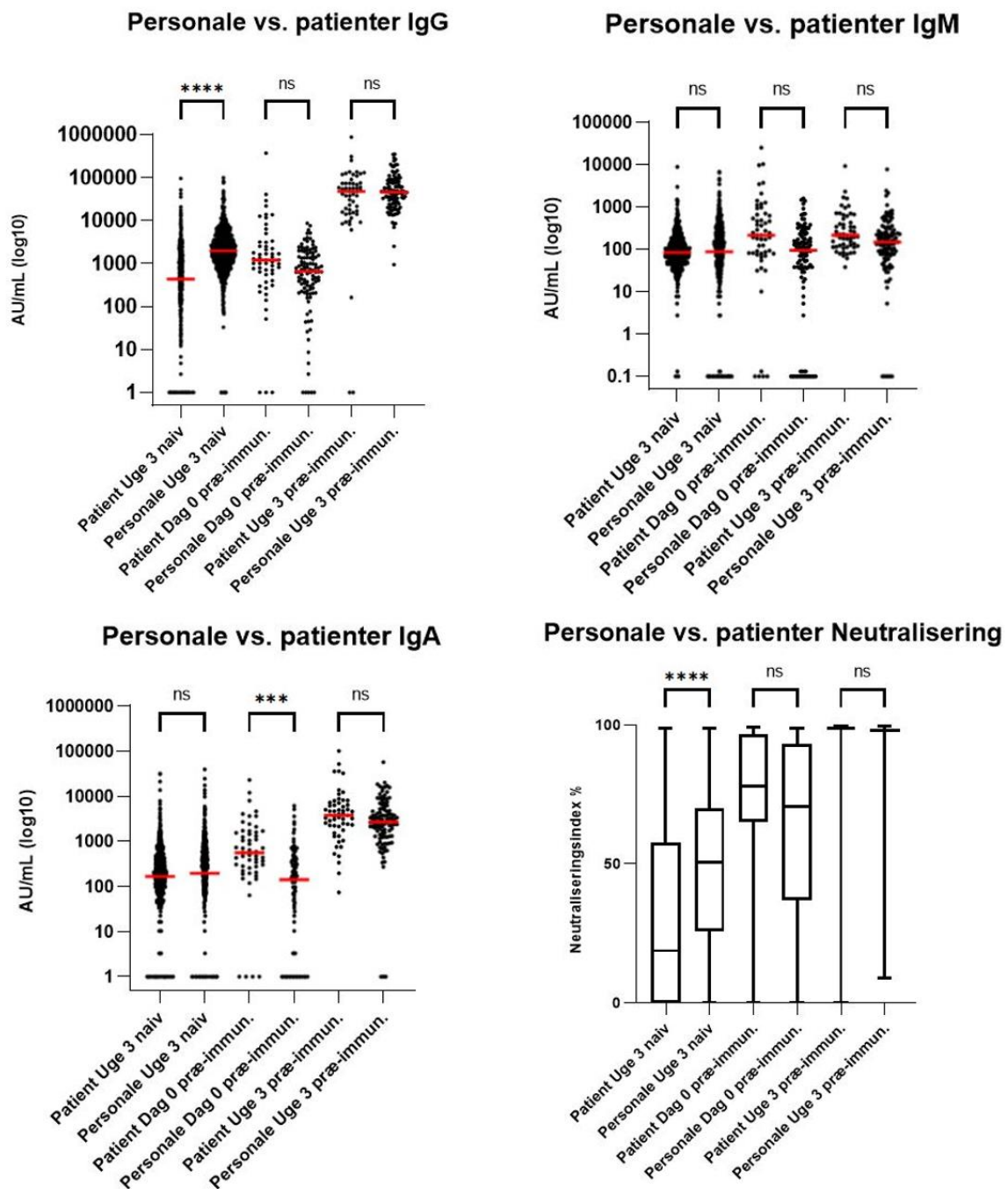
På figuren kan det ses, at det præ-immuniserede personale har en større spredning i neutraliseringsindex end hos de præ-immuniserede patienter.



Figur 17: Neutraliseringsgrad for patienters samt personales 0-dags prøve sammenlignet med neutraliseringsgraden 3 uger efter første vaccination. Figuren er opdelt efter de to grupper, data er illustreret ved boxplot. På x-aksen ses prøvetidspunktet samt inddeling af individerne i naive og præ-immuniserede, og på y-aksen ses neutraliseringsindex i procent. Stjernerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. *p<0.05 ****p<0.0001. Sammenligninger med ingen signifikant forskel fremstår ikke på figuren.

På figur 18 ses en sammenligning af antistofrespons hos patienter og personale, som er lavet ved en Kruskal-Wallis test med en multiple sammenligning. Vi kan se, at der er en signifikant forskel for de naive individers uge 3 prøve for IgG responset, hvor personalet har et højere respons end patienterne. Der ses ikke en signifikant forskel mellem de præ-immuniserede grupper, undtaget for IgA responset ved 3 ugers prøven. Her ses det lidt overraskende, at patienterne har højere niveauer end personalet.

På figur 18 ses også sammenligning af neutraliseringsgrad på patienter og personale. Her ses samme tendens som ved IgG respons, hvor personalet har en signifikant højere neutraliseringsgrad end patienterne i den virus-naive gruppe. Men for de præ-immuniserede individer er neutraliseringsresponsen ikke statistisk forskelligt mellem personale og patienter hverken ved 0-prøven eller 3 uger efter første vaccination.



Figur 18: Antistofniveauer af IgG, IgM, IgA samt neutraliseringsindex fra patienterne sammenlignet med personalet. Data illustreres ved dotplot. På x-aksen ses prøvetidspunktet samt inddeling af individerne i naive og præ-immuniserede, samt hvilken gruppe de tilhører, og på y-aksen ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. Neutralisering er illustreret ved dotplot, og har neutraliseringsindex i % på y-aksen. Stjerneerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. ****p<0.0001, ns angiver at der ikke er en signifikant forskel (no significance).

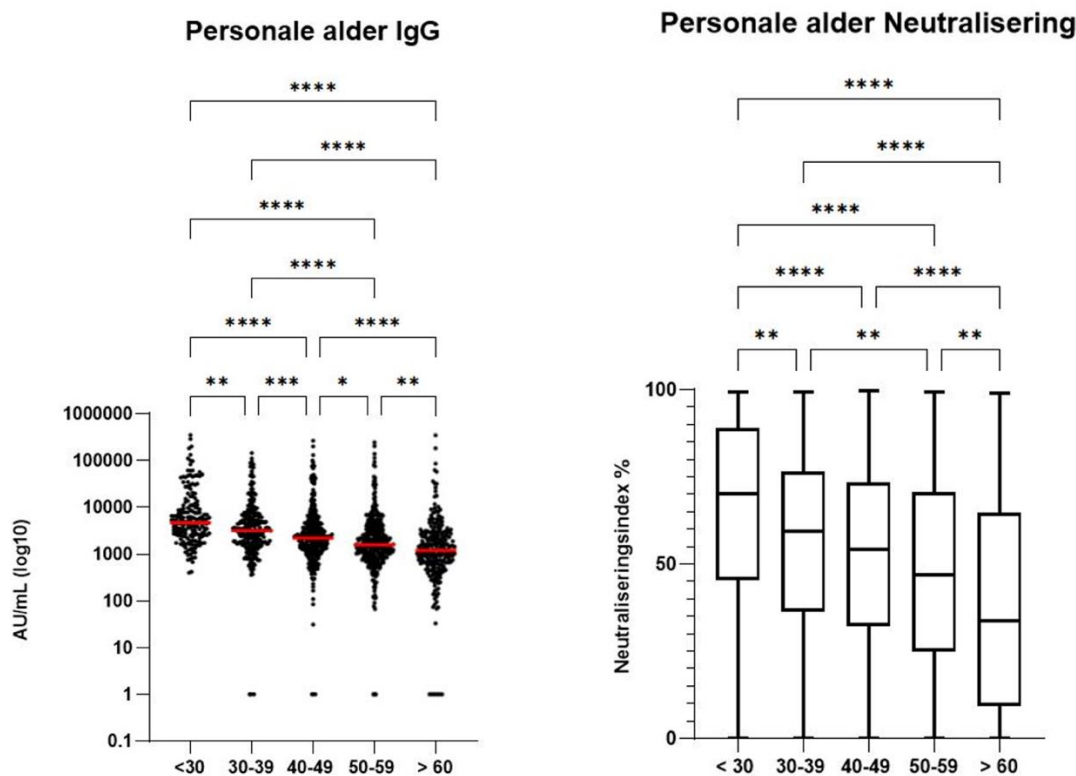
Udover sammenligning af antistofniveau for naive og præ-immuniserede individer, laves yderligere en undersøgelse som sammenligner alder og køn for patienter og personale. Sammenligningerne er lavet for IgG responset samt RBD:ACE-2 neutraliseringsevne, hvor der for sammenligning af alder bruges Kruskal-Wallis test med en multiple sammenligning som ses i bilag 2 og 3. Alder opdeles i 10-

års intervaller, som ses på figur 19. Til sammenligning af køn bruges en Mann-Whitney test, hvor uddybning af testens resultater kan ses i bilag 2 og 3.

På figur 19 ses sammenligning af personalets antistofniveau og neutraliseringspotentiale, hvor der ses en stor signifikant forskel mellem de forskellige aldersgrupper. Der ses en tydelig tendens til, at der er et faldende antistofniveau og neutraliseringspotentiale i takt med stigende alderen.

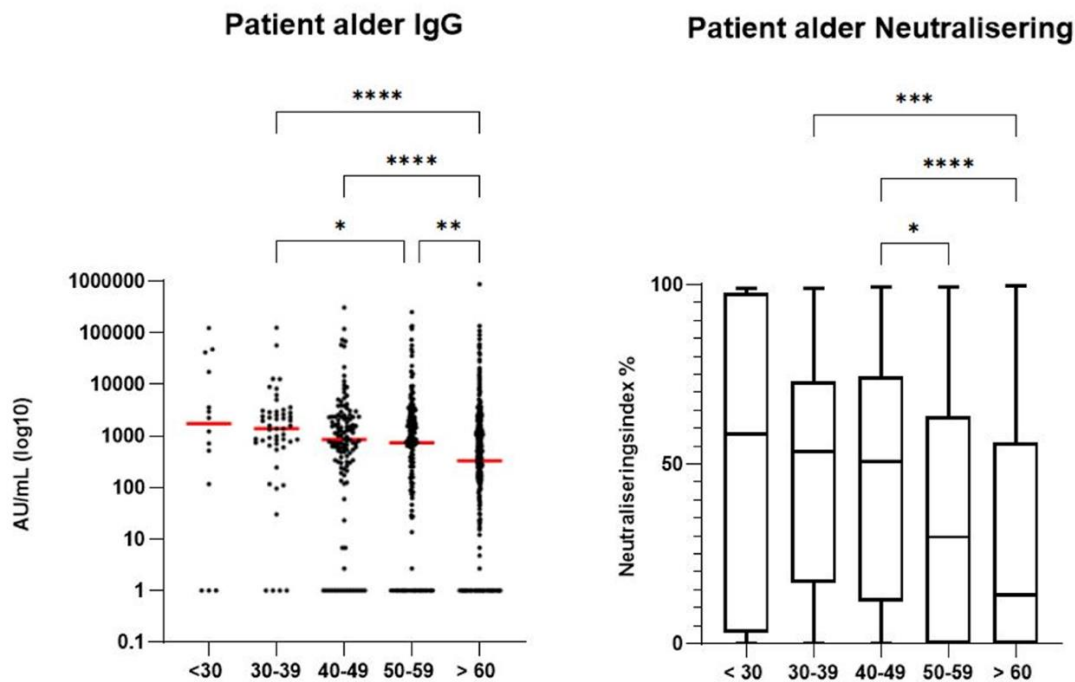
For personalegruppen ses der en tydelig forskel på alle aldersgrupper ved sammenligning af IgG respons, der ses en negativ korrelation mellem alder og IgG responset. Her ses den mindste forskel mellem aldersgrupperne 40-49 og 50-59.

Ved sammenligning af neutraliseringsgrad for personale ses en stor signifikant forskel på alle aldersgrupper. Hos patienterne ses derimod ingen signifikant forskel mellem aldersgrupperne 30-39 mod 40-49 og 40-49 mod 50-59, men en stor signifikant forskel mellem de resterende grupper.



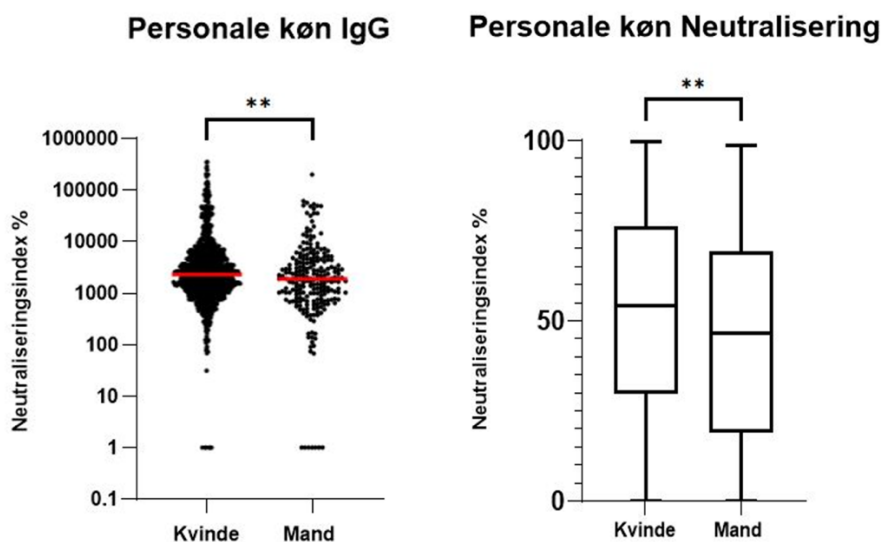
Figur 19: Personalets antistofniveau og neutraliseringsindex afhængig af alder. Data illustreres ved dotplot og boxplot. På x-aksen ses alder, og på y-aksen til venstre ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. På y-aksen til højre ses neutraliseringsindex angivet i procent. Stjerneerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. Medianen er angivet ved en rød streg. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. *p<0.05, **p<0.01, ***p=0.0005 og ****p<0.0001

På figur 20 ses en sammenligning af patienternes antistofniveau og neutraliseringspotentiale afhængig af alder. Der ses samme tendens som for personalet, at antistofniveauet samt neutraliseringspotentialet falder i takt med stigende alder. Dog er forskellene ikke lige så markante her, som for personalet. Der ses en stor signifikant forskel mellem de ældste aldersgrupper, men ingen signifikant forskel på gruppen <30 sammenlignet med de andre.



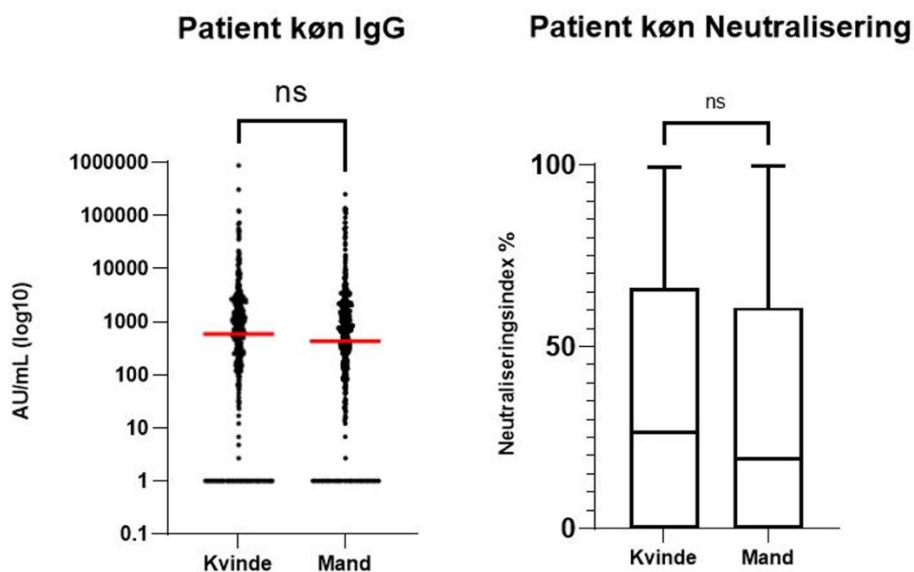
Figur 20: Patienternes antistofniveau og neutraliseringsindex sammenlignes med alder. Data illustreres ved dotplot og boxplot. På x-aksen ses alder, og på y-aksen til venstre ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. På y-aksen til højre ses neutraliseringsindex angivet i procent. Medianen er angivet ved en rød streg. Stjerneerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. *p<0.05, **p<0.01, ***p=0.0005 og ****p<0.0001

På figur 21 ses personalets fordelingen af IgG respons samt neutraliseringspotentialet ved opdeling af køn. Der ses en signifikant forskel mellem mænd og kvinder, hvor der er en tydelig tendens til, at kvinder generelt har højere respons end mænd både hvad angår IgG-respons og RBD:ACE-2 neutralisering.



Figur 21: Personalets antistofniveau og neutraliseringsindex afhængig af køn. Data illustreres ved dotplot og boxplot. På x-aksen ses køn, og på y-aksen til venstre ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. På y-aksen til højre ses neutraliseringsindex angivet i procent. Stjerneerne indikerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. **p<0.01.

På figur 22 ses patienternes fordeling ved opdeling af køn. Statistisk er der ingen signifikant forskel mellem mænd og kvinder. Dog ses det på medianen at kvindes respons ligger en smule højere end mænds.



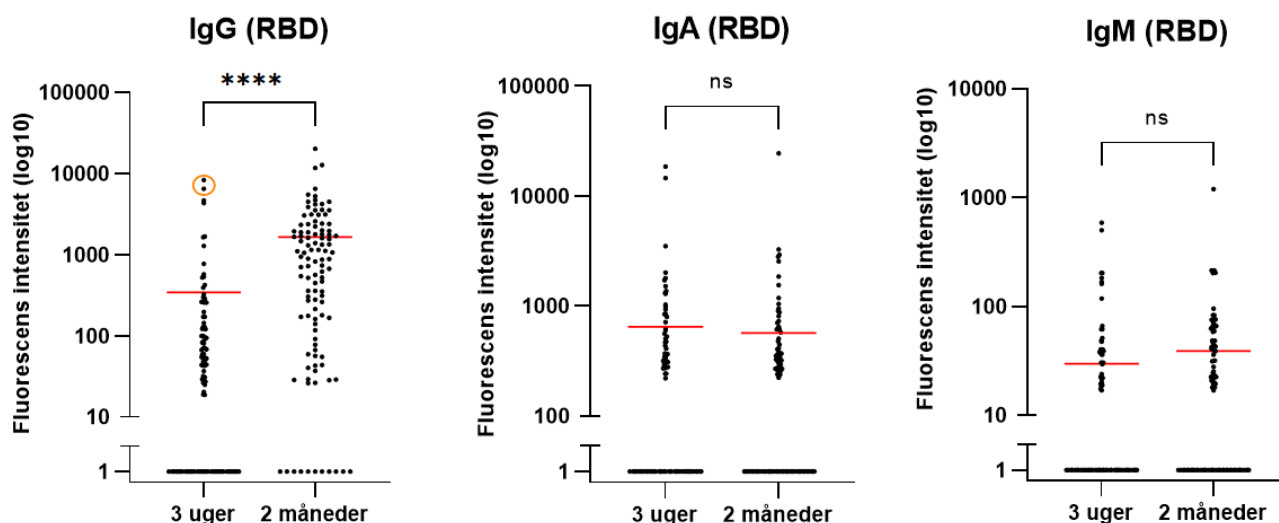
Figur 22: Patienters antistofniveau og neutraliseringsindex afhængig af køn. Data illustreres ved dotplot og boxplot. På x-aksen ses køn, og på y-aksen til venstre ses koncentration af antistoffet angivet i AU/ml på log10 skala. På y-aksen til højre ses neutraliseringsindex angivet i procent. Stjerne markerer signifikans beregnet vha. en Kruskal-Wallis test. En p-værdi <0.05 anses som signifikant. ns angiver at der ikke er en signifikant forskel (no significance).

Mucosalt slimhinde respons

Antistofrespons for IgG, IgA og IgM mod RBD blev målt i spyt fra 108 patienter 3 uger og 2 måneder efter COVID-19 vaccination med Pfizer/BioNTech BNT162B2 vaccinen. Ud af disse 108 patienter er 70 patienter testet serologiske protein-N-negative på Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet. De resterende 38 patienter er ikke testet for protein N på Klinisk Biokemisk Afdeling, men stadig inkluderet i undersøgelsen.

Antistofniveauerne for IgG, IgA og IgM fra uge 3 sammenlignes med antistofniveauerne fra 2 måneders prøvedagen. Dette gøres ved en parret non-parametrisk t-test kaldet Wilcoxon test, hvor testens resultater kan ses i bilag 5, 6 og 7.

På figur 23 angives prøvetidspunktet efter vaccinen på x-aksen og y-aksen angiver fluorescensintensiteten (FI). Denne intensitet aflæses fra Luminex hvorefter baggrundsstøjen, resultater fra blanke brønde, fratrækkes fra FI-værdien. Der er fastsat en cut-off værdi hvor alle værdier under grænsen har fået værdien 1. Ved IgG er cut-off 17.18 FI, IgA har et cut-off på 219.41 FI og IgM har cut-off 16.91 FI.



Figur 23: Antistofniveauer mod RBD fra patienter 3 uger efter vaccination sammenlignet med antistofniveauerne 2 måneder efter første vaccination. Det illustreres ved dotplot hvor x-aksen angiver prøvetidspunkt efter vaccine og y-aksen angiver fluorescensintensiteten. Den røde streg indikerer gennemsnittet og den orange ring omslutter to præ-immuniserede patienter. Stjerneerne indikerer signifikansniveau beregnet vha. fra en Wilcoxon, hvor p-værdi <0.05 anses som signifikant. ****p<0.0001.

For Pfizer/BioNTech vaccinerede patienter ses et signifikant højere IgG slimhinderespons efter 2 måneder sammenlignet med 3 ugers prøverne, hvilket illustreres på figur xx. De to prøver der giver højest signal i 3 ugers prøven ved IgG-responset (omringet med orange ring) er tidligere SARS-CoV-2 smittede. Dette fandt vi ud af, da de blev serologisk testet protein-N-positive på Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet.

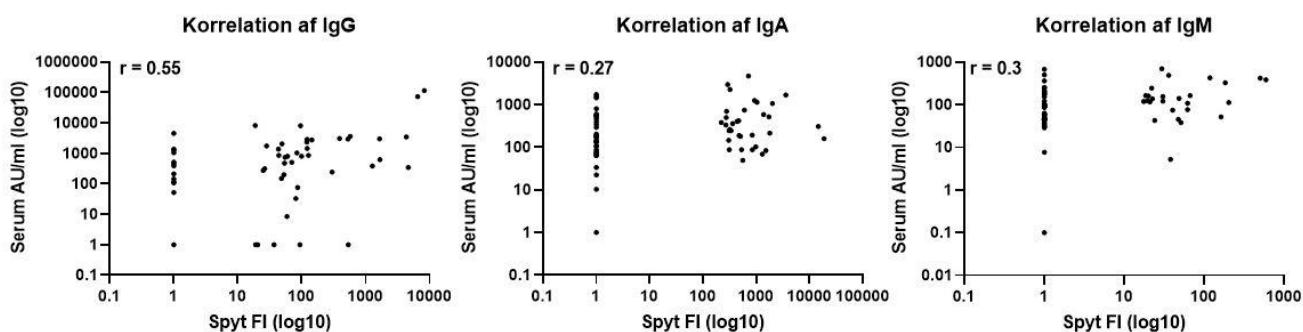
Antistofresponset for IgA og IgM ændres ikke signifikant hvilket også kan ses ved prøvernes fordeling på y-aksen og det tilhørende gennemsnit.

Serologisk versus mucosalt slimhinde respons

Antistofniveauerne for IgG, IgA og IgM i serum og spyt hos 70 patienter sammenlignes ved en Spearman Rank korrelationstest, hvor testen ses i bilag 8, 9 og 10 Dette gøres for at undersøge hvorvidt der er korrelation mellem disse respons. Niveauerne for antistofferne sammenlignes fra to forskellige platforme; ELISA og Luminex, hvor responset angives i henholdsvis arbitrary units (AU/ml) og fluorescensintensiteten (FI).

På figur 24 ses en ikke-signifikant korrelation ved nogle af antistofresponserne (alle isotyper), og r-værdierne til alle korrelationer er ikke høje. Dog ses det ved hjælp af dot-plottet, at tætheden ved IgA og IgM er mere markant ved de høje værdier. Ved IgG er værdierne mere spredt, hvilket illustreres ved hjælp af dotplottet.

For alle tre isotyper ses det, at nogle værdier er placeret ved 1 på enten x-aksen eller y-aksen. Dette er prøver som ikke har målbare værdier i ELISA eller Luminex. Ud af de 70 patienter er der ikke målbare antistofresponsværdier for 30, 36 og 44 patienter i henholdsvis IgG, IgA og IgM-responset i Luminex platformen. I ELISA er der ikke målbare værdier for 20, 2 og 4 patienter i henholdsvis IgG, IgA og IgM-responset.



Figur 24: Korrelation mellem serum og spyt for IgG, IgA og IgM. Antistofniveauer for vaccinerede patienter sammenlignes ved hjælp af en Spearman Rank korrelationstest. På x-aksen ses antistofresponset i spyt angivet i FI og på y-aksen ses antistofresponset i serum angives i AU/ml hvor begge akser er log10-transformeret.

Diskussion

I følgende afsnit fortolkes og diskuteres resultaterne for det serologiske og mucosale slimhinde projekt efterfulgt af en diskussion om projekterne samlet.

Serologisk respons

Det serologiske respons projekt blev udført med henblik på at undersøge antistofniveauer samt virusneutraliseringsevne hos COVID-19 vaccinerede patienter og personale fra Region Hovedstaden. Prøvematerialet er indsamlet inden BNT162b2 vaccination og 3 uger efter første vaccination. Der findes ikke en prøve taget 2 måneder efter første vaccination, da prøverne ikke var frigivet fra Biobanken på Rigshospitalet på tidspunktet for dette bachelorprojekt. Denne 2 måneders prøve kunne have givet vigtig information om, hvordan det sekundære/fuldmodne immunrespons ser ud efter færdig COVID-19 vaccination. Derudover ville denne prøve kunne bruges til at undersøge hvorvidt de præ-immuniserede individer kunne nøjes med en enkelt vaccination.

På figur 15 og 16 ses antistofniveauer for IgG, IgM og IgA hos både patienter og personale. Resultaterne viser, at der primært udvikles et IgG drevet respons, da vi har kunne måle markant højere IgG-antistofniveauer i forhold til både IgM og IgA. Derudover ses det, at der er stor forskel på de naive og de præ-immuniserede individer, hvilket kan skyldes, at de præ-immuniserede individer allerede har udviklet et primært hukommelsesrespons inden vaccinationen og dermed videremodne på eksisterende B- og T lymfocytter. I forhold til B-lymfocytterne vil de gennemgå en sekundær selektionsproces i lymfeknuderne tæt på indstiksområdet, der blandt andet involverer yderligere affinitetsmodning af B-celle receptorerne og antistofferne. Det kan ses ud fra at disse individer havde meget højere antistofniveauer og derfor kan der konkluderes, at første vaccination udløser et boost/sekundært respons i de individer der tidligere har været smittet.

Samme tendens ses for neutraliseringsindex på figur 17. Vi har dog ikke kunne måle på affiniteten af disse antistoffer, da de repræsenterer et polyklonalt respons. Men i vores forskningsgruppe er der lavet disse affinitetsmålinger på monoklonale antistoffer udviklet prækliniske modeller i mus med tilsvarende immuniseringsstrategier (30). Dette stemmer overens med et studie fra University of Maryland School of Medical Medicine (31). Her er der undersøgt antistofniveauer samt neutraliseringspotentiale på sundhedspersonale, hvor disse inddeles i naive og præ-immuniserede individer. I lighed med vores studie ses der markant højere antistofniveauer og bedre

virusneutralisering hos de præ-immuniserede individer. På baggrund af dette kunne man foreslå en omlægning af vaccinstrategien, hvor tidligere SARS-CoV-2 smittede individer nedprioriteres eller kun skal have én vaccine dosis for at være færdigimmuniseret, for at økonomisere med de svært tilgængelige vacciner. Dette understøtter vores resultater også, da de viser at baseline for vaccinerespons ved de præ-immuniserede individer svarer til respons hos de naive individer der har fået første vaccine. Da det i vores studie, af tidsmæssige årsager, ikke har været muligt at analysere 2 måneders prøven for færdigvaccinerede individer, kan det ikke på nuværende tidspunkt endeligt konkluderes om hvorvidt de præ-immuniserede individer kan nøjes med en enkelt vaccination. Et opfølgende studie kunne afklare dette spørgsmål. Men det blevet delvist belyst i en anden undersøgelse (med færre inkluderede forsøgspersoner), hvor resultaterne viste at de præ-immuniserede udvikler samme vaccinerespons som færdigvaccinerede naive individer allerede efter første vaccination (32).

Ved sammenligning af personale og patienter ses der en signifikant forskel på 3 ugers prøven for de naives IgG respons samt neutraliseringsindex, dette ses på figur 18. Her har personalet udviklet et højere vaccinerespons end patienterne. Patienterne er tilknyttet forskellige afdelinger og har forskellige sygdomme, dog består gruppen primært af HIV- og hæmatologiske patienter som har forskellig grad af immunkompromitering. Dette kan have indflydelse på vaccinerespons, hvorimod det må forventes at personalet har en bedre sundhedsstatus. Alle naive individer har haft samme udgangspunkt da vaccinen er steril, og derfor er det kun immunforsvaret for de enkelte individer der har indflydelse på respons. Derfor ser det ud som om at personer med immunkompromitering ikke har samme stærke beskyttelse mod COVID-19 som personer med normal sundhedsstatus.

I figur 18 ses det, at der er et signifikansniveau på <0.0001 ved dag 0 prøven ved de præ-immuniserede IgA respons. Dette stemmer overens med tidligere undersøgelser der viser at sygdomssværhedsgrad påvirker antistofniveauet (8).

Dette studie viste, at der er en korrelation med sygdomssværhedsgrad og antistofniveau hvilket betyder at antistofniveauer stiger jo alvorligere sygdomsforløbet har været. De immunkompromitterede patienter kan have haft svære og længerevarende sygdomsforløb end personalet og vil derfor danne højere niveauer af antistoffer. På de andre figurer der viser sammenligningen mellem personale og patienter ses på spredningen og medianen, at der måles højere vaccinerespons på de præ-immuniserede patienter frem for de præ-immuniserede personale, dog er forskellen ikke signifikant. Det er den store ubekendte, at dag 0 prøven er taget lige inden første vaccination, og det vides derfor ikke hvor lang tid prøven er taget efter individerne, har været smittet.

På figur 19 og 20 ses det, at alder har stor indflydelse på vaccinerespons. Der ses store signifikante forskelle mellem de forskellige aldersgrupper, og der ses en klar sammenhæng at ved stigende alder falder vaccinerespons. En af grundene til dette kunne være, at T-celle respons falder markant med alderen i forbindelse med thymus degenerering. Dermed kan ældre mennesker have svært ved at reagere med "nye" patogener, hvis de ikke tidligere i livet har lavet et cellulært hukommelsesrespons mod det pågældende patogen eller tætbeslægtede varianter. Og da et veletableret B-cellemodning er helt afhængig af T celler (CD4+/T hjælper celler), vil thymus funktionen påvirke antistofrespons dramatisk.

Der ses en mere markant forskel på de forskellige aldersgrupper hos personalet fremfor patienterne. Dette kan dels skyldes at de yngre patienter er underrepræsenteret, dette kan gøre det svært at konkludere på disse data da det ikke kan vides med sikkerhed hvordan udfaldet er ved flere patienter i de yngre aldersgrupper. Patienterne i aldersgrupperne under 40 år har en stor spredning, derfor mistes der noget statistisk power for disse. Det kan også skyldes som tidligere nævnt, at de yngre grupper patienter udgør en heterogen gruppe, domineret af blandt andet hæmatologiske patienter og HIV-patienter, som alle er immunkompromiteret i forskellig grad. Personalet fordeler sig nogenlunde ligeligt i de forskellige aldersgrupper, og må forventes at have en mere homogen (sund/rask) profil. Derfor antager vi, at disse data er mere pålidelige.

Personalet er imidlertid en meget heterogen gruppe hvad angår køn, da denne gruppe består af 84% kvinder. Det giver en skævhed i fordelingen, og det kan have indflydelse på det statistiske udfald. På figur 21 og 22 ses, at der er en signifikant forskel mellem kvinder og mænds vaccinerespons hos personalet, denne samme forskel ses ikke hos patienterne. Dog ligger medianen for kvinderne højere end mændene i patientgruppen, hvorfor køn også må have en vis betydning for udviklingen af vaccinerespons.

Mucosalt slimhinde respons

Det mucosale respons projekt blev udført med henblik på at undersøge antistofresponset i spyt hos COVID-19 vaccinerede individer, da det endnu ikke vides om mRNA-vacciner inducerer en egentlig slimhindeimmunitet.

Prøvematerialet blev indsamlet fra en lille (108) gruppe patienter 3 uger og 2 måneder efter første Pfizer/BioNTech vaccination, svarende til henholdsvis marts og april måned i 2021. Der mangler 0-prøver på projektets deltagere, som skyldes, at første vaccinationsstik blev givet i februar måned. Manglen af denne prøve skyldes, at projektet blev igangsat i start marts, men en 0-prøve ville kunne give et betydningsfuldt indblik i det mucosale baseline respons, samt om patienterne tidligere har været smittet med SARS-CoV-2.

Til vores overraskelse, giver den sterile COVID-19-vaccine giver et væsentligt forøget saliva IgG antistofrespons, hvilket kan ses i figur 23, hvilket kan betyde, at IgG kan have en væsentlig del i det mucosale immunrespons. Det var lidt uventet, at der er et dominerende IgG respons i spytpøverne, da vi havde forventet at se det primært i det serologiske materiale.

På figur 23 ses det, at der kommer et markant IgG-respons, som er meget dominerende efter første og anden vaccine og resulterer i, at der er langt færre patienter i 2 måneders gruppen som er negative for IgG-respons. De to højeste værdier i IgG-responset er markeret med en orange ring, da disse to patienter er testet protein-N-positive og her dermed tidligere været inficeret. Dette resulterer i, at disse to patienter opnår et sekundært respons allerede efter første vaccine og giver derfor et højt IgG-respons ved 3 uger. For de selvsamme to patienter sås det, at de var IgA og IgM positive efter første og anden vaccination, men overraskende havde de ikke et markant højere antistofrespons end de resterende patienter der er COVID-19-naive.

Andre studier rapporterer om påvisning af antistoffer mod protein S og RBD i spytpøver, hos sundhedspersonale vaccineret med blandt andet BNT162b2 vaccinen fra Pfizer/BioNTech (33,34).

Størstedelen af deltagerne havde efter anden vaccine dannet IgG-antistoffer mod protein S og RBD i deres spyt, samtidig med at der blev fundet en signifikant andel af IgA-antistoffer i spyttet. Disse resultater viser, at mRNA-vaccinen fra Pfizer/BioNTech inducerer humoral immunitet, som til en vis grad kan påvises i spyt. Derudover viste studiet, at IgG-antistofferne i spyttet i vid udstrækning stammer fra plasma, som passerer endothelet i det vaskulariserede tandkød.

Nogle patienter udviser både serologisk og mucosalt IgA-respons, selvom de ikke tidligere har været smittet (har udviklet IgA memory celler fra COVID-19-infektion). Dette er overraskende da vi havde forventet, at der primært modnes IgA plasmaceller i tarm-associeret og slimhinde-associeret lymfoidt væv (MALT og GALT) i forbindelse med vaccination og ikke ved en steril vaccine. Da vaccinen gives intramuskulært, og dermed bliver præsenteret i den regionale drænende lymfeknude, kunne det forventes, at der primært (næsten udelukkende) udvikles IgG-antistoffer i det modne respons. Der skal nævnes, at hvor nogle patienter udviser et klart IgA-respons, er der også flere patienter, der slet ikke viser målbare IgA antistoffer mod RBD. Umiddelbart ser det ikke ud som om, at IgA er prædiktiv for det mucosale slimhinde antistofrespons. Vores studie viser derimod at IgG-responset er det dominerende i spyt.

Vores projekt viser dog at IgA-antistofniveauet overstiger niveauet af IgM, hvilket et andet studie fra Canada også rapporterer (3). Studiets undersøgelser afslører, at sekretorisk IgA frem for IgM er signifikant mere til stede i slimhindeoverflader og sekreter, hvor antistofferne er centrale for slimhindeimmunitet. I dette studie konkluderes, at IgA-antistoffer udskilt af plasmaceller i luftvejene er en nøglefaktor for slimhindeimmunitet via patogenneutralisering som forhindrer den indledende SARS-CoV-2-infektion. Traditionelt set repræsenterer IgM et forholdsvist umodnet B-celle-respons, og da der ikke er aktiv transport af IgM over det mucosale epithel, havde vi heller ikke forventet et stort IgM respons.

Det er dog fortsat uklart om der er forskel på effektiviteten og varigheden af immunitet opnået ved enten en naturlig SARS-COV-2-infektion eller en steril vaccine.

Serologisk versus mucosalt slimhinde respons

Det serologiske antistofrespons sammenlignes med det mucosale slimhinde antistofrespons for at undersøge om der er en korrelation mellem antistofniveauerne. Dette gøres for 70 patienter som både har afgivet serum og spyt.

Resultaterne viste en ikke-signifikant korrelation mellem respons for både IgG, IgA og IgM SARS-CoV-2 specifikke antistoffer. Ud fra figur 24 kan det ses, at mange prøver giver et signal på 1, hvilket giver en negativ værdi og dermed trækker de statistiske parametre ned.

Hvis man ekskluderer alle 'ikke-responderende' i enten det serologiske respons eller det mucosale slimhinde respons, så reduceres antallet af prøver til 35, hvor det ses at der er en signifikant, men ikke høj signifikant sammenhæng mellem IgG responserne (p værdi 0.094 og r-værdi 0.31). Der er ingen korrelation for IgA og IgM. Vi har dog valgt ikke at præsentere disse data i figurformat, da det involverer eksklusion af prøver uden velbegrundet årsag.

Antallet af inkluderede patienter i denne komparativ analyse er kun 70 individer, og det skyldes manglen på forsøgsindivider med kombinerede serumprøver og spytp prøver. Denne lille mængde

datasæt resulterer i mangel på statistisk power. Her er der mulighed for forbedring på forsøget, da flere inkluderede prøver muligvis ville kunne give en bedre korrelation. Der ses der en lille tendens til, at en del af de prøver med høje værdier i det mucosale slimhinde respons også giver høje værdier i det serologiske respons.

Perspektivering

Tilbage i marts 2020 erklærede Verdenssundhedsorganisationen (WHO) COVID-19-udbruddet som en pandemi, som siden da har resulteret i op mod 172.630.637 bekræftede tilfælde hvoraf virussen har været skyld i 3.718.683 menneskeliv (35). Mange menneskers liv er påvirket af pandemien og sundhedssystemer verden over er blevet belastet. Regeringer har udstedt en række bekendtgørelser og restriktioner, som begrænser menneskelig aktivitet for at bremse spredningen af SARS-CoV-2 (36).

COVID-19-vaccination er vejen ud af pandemien, da en veludført vaccinationsstrategi kan genoprette den normale status i samfundet uden en fremtidsudsigt med langvarige restriktioner og adfærdsmæssige foranstaltninger. Vaccinen mod SARS-CoV-2 resulterer i et bredere smitteforebyggende samfund, men også sygdomsforebyggelse hos det enkelte individ.

I Danmark er vaccinationsprogrammet opbygget efter prioriteringsliste, hvor de grupper med størst risiko for et alvorligt forløb efter infektion med SARS-CoV-2 er i højeste prioritet. Udrulning af COVID-19-vaccinerne resulterer i minimering af død og alvorlig sygdom som følge af COVID-19, og det minimerer smittespredningen og sikrer kontrol med pandemien, samtidigt med at samfundskritiske nøglefunktioner beskyttes (36).

Ved vaccination mod COVID-19 startes et immunrespons, der aktiverer immunforsvaret hvorved der produceres antistoffer mod det specifikke antigen (protein S). Selvom COVID-19-immuniteten endnu ikke er fuldt forstået, tyder det på, at antistofudviklingen giver en vis grad af immunitet over for efterfølgende infektioner. Det vides endnu ikke hvor længe denne immunitet varer, men studier viser at omfanget af immunrespons mod SARS-CoV-2 er proportionelt med sygdomsintensiteten (8).

Sundhedsstyrelsen har vurderet, at immuniteten ikke kan forventes at være varig efter første vaccination. Derfor er COVID-19-vaccineprogrammet opbygget således, at man skal modtage to vacciner af Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinen for at booste effekten af den første vaccination (37). Anden vaccination resulterer i en beskyttende immunitet, da der opnås et markant højere antistofniveau og mere affinitetsmodnede B-celler/antistoffer, hvilket dette projekt kan vise i både den mucosale og serologiske del.

Regeringen og aftalepartierne i Danmark har indgået en aftale om udmøntning af genåbning pr. 21 maj 2021, som indebærer nye regler der lemper reglerne for vaccination. Dette betyder, at efter første COVID-19-vaccination er det muligt at anvende coronapasset som delvist gyldigt 14 dage efter vaccinen og frem til 42 dage efter vaccinen. Dette betyder dermed også at coronapasset er gyldigt umiddelbart efter modtagelse af den sidste vaccinedosis - og ikke efter 14 dage som tidligere.

Projektets resultater viser, at den første vaccine giver god beskyttelse mod SARS-CoV-2 hos naive individer, hvilket stemmer overens med regeringens valg om en delvis vaccination og coronapas

efter første vaccine. Dette er en udfasning af restriktionerne, og starten på en fremtid hvor menneskelig social aktivitet kan blive en realitet igen.

Derudover viser projektet at præ-immuniserede individer udvikler et stærkt vaccinerespons allerede efter første vaccination. Derfor kan det argumenteres for, at disse individer måske kun behøver en enkelt vaccination eller om en eventuel nedprioritering i vaccineprogrammet, da der allerede er etableret et primært forsvar mod COVID-19 infektion. Det ville kunne spare samfundet både tidsmæssigt og ressourcemæssigt i en tid, hvor relevante vacciner er en mangelvare.

Resultaterne for patienternes serologiske antistofstofsrespons er lavere end sundhedspersonalets vaccinerespons, derfor kunne det foreslås at have fokus på denne patientgruppe og vaccinemonitoring på den lange bane. Ligeledes ses det tydeligt at alder har en effekt på vaccineresponsen, hvilket kunne resultere i, at der skal monitoreres mere grundigt efterfølgende på vaccinationsprogrammet hos den ældre del af befolkningen.

Konklusion

Dette bachelorprojekt undersøger antistofrespons mod SARS-CoV-2 efter vaccination med Pfizer/BioNTech BNT162b2 vaccinen, hvor resultaterne giver et indblik i den serologiske og mucosale antistofmedierede immunitet efter vaccination.

Projektet viser, at BNT162b2 vaccinen udløser et serologisk respons som er målbart efter 3 uger. Vaccineresponsen afhænger af flere faktorer, blandt andet kan det konkluderes, at alder har stor indflydelse på vaccineresponsen, således at responsen falder signifikant med alderen. Derudover kan der konkluderes, at tidligere COVID-19 smittede individer udvikler et markant vaccinerespons allerede efter første vaccination, og det kunne derfor foreslås, at disse individer nøjes med en dosis af vaccinen for at opnå fuld beskyttelse.

Den sterile BNT162b2 vaccine resulterer i et væsentligt forøget IgG-antistofrespons, som er meget dominerende efter første og anden vaccination. Udover at danne IgG-antistoffer mod RBD i spyttet er der også fundet en vis andel af IgA-antistoffer, som viser at mRNA-vaccinen fra Pfizer/BioNTech måske kan inducere mucosal humoral immunitet.

Der er ikke påvist en signifikant korrelation mellem antistofniveauerne for IgA og IgM i serum og spyt, men der er en vis sammenhæng mellem IgG-responsen. Det er dog fortsat uklart om effektiviteten og varigheden af immunitet er opnået ved en naturlig SARS-COV-2-infektion og en vaccinemedieret immunitet.

Referenceliste

1. Coronavirus disease (COVID-19) [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>
3. Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois M-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections [Internet]. Available from: <https://www.beronigroup.com/covid-19/>
4. COVID-19: Forebyggelse af smittespredning [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2020/Corona/Forebyggelse-af-smittespredning/Forebyggelse-af-smittespredning-publikation.ashx?la=da&hash=FD3E64042EEDB7A6C3305BD37A003B5B58B1BC79>
5. Coronavirus (COVID-19) | faktalink [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://faktalink.dk/coronavirus-covid-19>
6. Om covid-19 [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://covid19.ssi.dk/om-covid19>
7. Kong W-H, Zhao R, Zhou J-B, Wang F, Kong D-G, Sun J-B, et al. Serologic Response to SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients with Different Severity. *Viol Sin* [Internet]. 35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00270-x>
8. Hansen CB, Jarlhelt I, Pérez-Alós L, Hummelshøj Landsy L, Loftager M, Rosbjerg A, et al. SARS-CoV-2 Antibody Responses Are Correlated to Disease Severity in COVID-19 Convalescent Individuals. *J Immunol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jun 4];206(1):109–17. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/206/1/109>
9. Assadiasl S, Fatahi Y, Zavvar M, Nicknam MH. COVID-19: Significance of antibodies. Vol. 28, *Human Antibodies*. IOS Press BV; 2020. p. 287–97.
10. Sådan virker vacciner - Sundhedsstyrelsen [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.sst.dk/da/Viden/Vaccination/Fakta-om-vaccination/Saadan-virker-vacciner>
11. Kanstrup Holm C. *Immunologi*. 1st ed. FADL'S forlag; 2020. 360 p.
12. Virus replication | British Society for Immunology [Internet]. [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/virus-replication>
13. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In: *Coronaviruses: Methods and Protocols* [Internet]. Springer New York; 2015 [cited 2021 Jun 4]. p. 1–23. Available from: </pmc/articles/PMC4369385/>
14. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Jun 4]. Available from: </pmc/articles/PMC7723891/>
15. Byrnes JR, Zhou XX, Lui I, Elledge SK, Glasgow JE, Lim SA, et al. Competitive SARS-CoV-2 Serology Reveals Most Antibodies Targeting the Spike Receptor-Binding Domain Compete for ACE2 Binding. *mSphere* [Internet]. 2020 Oct 28 [cited 2021 Jun 4];5(5). Available from: <https://doi.org/10.1128/>
16. Abe KT, Li Z, Samson R, Samavarchi-Tehrani P, Valcourt EJ, Wood H, et al. A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. *JCI Insight* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited

- 2021 Jun 4];5(19). Available from: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142362>
17. Fehr AR, Perlman S. Chapter 1 Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 1282.
 18. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jun 30;527(3):618–23.
 19. Godkendelse af vacciner i EU [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://vaccination-info.eu/da/fakta-om-vacciner/godkendelse-af-vacciner-i-eu>
 20. How are vaccines developed? [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed>
 21. Comirnaty | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>
 22. Generelt om vacciner mod COVID-19 [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: [https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/temaer/Generelt om vacciner mod COVID-19/](https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/temaer/Generelt-om-vacciner-mod-COVID-19/)
 23. Godkendte vacciner mod COVID-19 [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: [https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/temaer/Godkendte vacciner mod COVID-19/#pfizer_hovedtekst](https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/temaer/Godkendte-vacciner-mod-COVID-19/#pfizer_hovedtekst)
 24. Andersen H, Sørensen UB, Thomsen E. *Immunkemiske metoder- Teori og praksis.* 1st ed. Nucleus; 2012.
 25. Pierce™ Premium Grade Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PG82072#/PG82072>
 26. NHS and Sulfo-NHS [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf
 27. Luminex Multiplex Assay Principle: R&D Systems [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>
 28. Luminex Assays | Thermo Fisher Scientific - DK [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/procartaplex-assays-luminex.html>
 29. Declaration of Helsinki World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.
 30. Rosbjerg A, Pérez-Alós L, Bo C, Bruun Johnsen L, Helgstrand C, Kryh Öberg F, et al. Vaccine monitoring shows that focused immunization with SARS-CoV-2 receptor-binding domain provides a better neutralizing antibody response than full-length spike protein 2 Author list: Rafael Bayarri-Olmos 1# , Manja Idorn Running title: Antibody neutral [Internet]. 2021 Jan [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.researchsquare.com>
 31. Saadat S, Rikhtegaran Tehrani Z, Logue J, Newman M, Frieman MB, Harris AD, et al. Binding and Neutralization Antibody Titers after a Single Vaccine Dose in Health Care Workers Previously Infected with SARS-CoV-2. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2021 Apr 13;325(14):1467–9.
 32. Ebinger JE, Fert-Bober J, Printsev I, Wu M, Sun N, Prostko JC, et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat Med* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Jun 5];1–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01325-6>
 33. Ketas TJ, Chaturbhuj D, Cruz-Portillo VM, Francomano E, Golden E, Chandrasekhar S, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines are detectable in saliva. *bioRxiv Prepr Serv Biol* [Internet]. 2021 Mar 11 [cited 2021 Jun 5]; Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33758842>

34. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. Blackwell Publishing Inc.; 2007 [cited 2021 Jun 5]. p. 288–311. Available from: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1196/annals.1384.012>
35. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://covid19.who.int/>
36. Vedr. fortsat udrulning af COVID-19 vaccine i Danmark uden Vaxzevri [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2021/Corona/Vaccination/Notater/Notat-vedr-fortsat-udrulning-af-COVID-19-vaccine-i-Danmark-uden-Vaxzevria140421.ashx?la=da&hash=BD137594D767A4C9C9C10DE443A042B728B4109E>
37. Immunitet efter infektion med COVID-19 eller vaccination mod COVID-19 [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2021/Corona/Vaccination/Immunitet-efter-infektion-med-COVID-19-eller-vaccination-mod-COVID-19.ashx?la=da&hash=FC872ABB0766E0C250A9FACAC2AEB3FDBF2A42F8>

Bilagsfortegnelse

Bilag 1: Tabel med fordeling af alder og køn	46
Bilag 2: Kruskal-Wallis og Mann-Whitney test af det serologiske respons personale	46
Bilag 3: Kruskal-Wallis Mann-Whitney test af det serologiske respons patienter	49
Bilag 4: Kruskal-Wallis test af det serologisk personale sammenlignet med patienter	53
Bilag 5: Wilcoxon test af IgG (mucosalt slimhinde respons)	57
Bilag 6: Wilcoxon test af IgA (mucosalt slimhinde respons)	57
Bilag 7: Wilcoxon test af IgM (mucosalt slimhinde respons)	58
Bilag 8: Korrelationstest Spearman Rank IgG (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)	58
Bilag 9: Korrelationstest Spearman Rank IgA (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)	58
Bilag 10: Korrelationstest Spearman Rank IgM (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)	59

Bilag 1: Tabel med fordeling af alder og køn

Personale		Patienter	
Alder	Antal	Alder	Antal
<30	182	<30	14
30-39	283	30-39	51
40-49	365	40-49	122
50-59	377	50-59	234
>60	253	>60	689

Kvinder	Mænd	Kvinder	Mænd
1227	233	521	589

Bilag 2: Kruskal-Wallis og Mann-Whitney test af det serologiske respons personale

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons	IgG					
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-1395	Yes	****	<0.0001	A-E	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 præ-immun,	-984.9	Yes	****	<0.0001	A-I	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 præ-immun,	-2138	Yes	****	<0.0001	A-M	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 præ-immun,	410.2	Yes	****	<0.0001	E-I	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 præ-immun,	-742.9	Yes	****	<0.0001	E-M	
Dag 0 præ-immun, vs. Uge 3 præ-immun	-1153	Yes	****	<0.0001	I-M	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	699.0	2094	-1395	1352	1352	44.81
Dag 0 naiv vs. Dag 0 præ-immun,	699.0	1684	-984.9	1352	108	12.17
Dag 0 naiv vs. Uge 3 præ-immun,	699.0	2837	-2138	1352	108	26.41
Uge 3 naiv vs. Dag 0 præ-immun,	2094	1684	410.2	1352	108	5.068
Uge 3 naiv vs. Uge 3 præ-immun,	2094	2837	-742.9	1352	108	9.177
Dag 0 præ-immun, vs. Uge 3 præ-immun	1684	2837	-1153	108	108	10.47

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgM				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-812.3	Yes	****	<0.0001	B-F	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	-821.2	Yes	****	<0.0001	B-J	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	-1113	Yes	****	<0.0001	B-N	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	-8.870	No	ns	>0.9999	F-J	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	-301.1	Yes	**	0.0017	F-N	
Dag 0 prae-immun, vs. Uge 3 prae-immun	-292.2	No	ns	0.0571	J-N	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	1013	1825	-812.3	1352	1352	25.50
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	1013	1834	-821.2	1352	108	9.915
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	1013	2126	-1113	1352	108	13.44
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	1825	1834	-8.870	1352	108	0.1071
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	1825	2126	-301.1	1352	108	3.636
Dag 0 prae-immun, vs. Uge 3 prae-immun	1834	2126	-292.2	108	108	2.593

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgA				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-1025	Yes	****	<0.0001	C-G	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	-951.5	Yes	****	<0.0001	C-K	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	-1849	Yes	****	<0.0001	C-O	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	73.02	No	ns	>0.9999	G-K	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	-824.6	Yes	****	<0.0001	G-O	
Dag 0 prae-immun, vs. Uge 3 prae-immun	-897.6	Yes	****	<0.0001	K-O	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	882.6	1907	-1025	1352	1352	34.24
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	882.6	1834	-951.5	1352	108	12.23
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	882.6	2732	-1849	1352	108	23.77
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun,	1907	1834	73.02	1352	108	0.9387
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun,	1907	2732	-824.6	1352	108	10.60
Dag 0 prae-immun, vs. Uge 3 prae-immun	1834	2732	-897.6	108	108	8.480

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons						
	Neutralisering					
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-1155	Yes	****	<0.0001	D-H	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 pr�e-immun,	-1395	Yes	****	<0.0001	D-L	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 pr�e-immun,	-2028	Yes	****	<0.0001	D-P	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 pr�e-immun,	-240.3	Yes	*	0.0204	H-L	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 pr�e-immun,	-873.6	Yes	****	<0.0001	H-P	
Dag 0 pr�e-immun, vs. Uge 3 pr�e-immun	-633.2	Yes	****	<0.0001	L-P	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	799.2	1954	-1155	1352	1352	36.59
Dag 0 naiv vs. Dag 0 pr�e-immun,	799.2	2194	-1395	1352	108	17.00
Dag 0 naiv vs. Uge 3 pr�e-immun,	799.2	2828	-2028	1352	108	24.72
Uge 3 naiv vs. Dag 0 pr�e-immun,	1954	2194	-240.3	1352	108	2.929
Uge 3 naiv vs. Uge 3 pr�e-immun,	1954	2828	-873.6	1352	108	10.65
Dag 0 pr�e-immun, vs. Uge 3 pr�e-immun	2194	2828	-633.2	108	108	5.670

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons						
	IgG					
Number of families						
Number of comparisons per family						
Alpha						
Dunn's multiple comparisons test	Summary	Adjusted P Value				
<30 vs. 30-39	**	0.0015	A-C			
<30 vs. 40-49	****	<0.0001	A-E			
<30 vs. 50-59	****	<0.0001	A-G			
<30 vs. > 60	****	<0.0001	A-I			
30-39 vs. 40-49	***	0.0005	C-E			
30-39 vs. 50-59	****	<0.0001	C-G			
30-39 vs. > 60	****	<0.0001	C-I			
40-49 vs. 50-59	*	0.0263	E-G			
40-49 vs. > 60	****	<0.0001	E-I			
50-59 vs. > 60	**	0.0063	G-I			
Test details	Mean rank diff.	n1	n2	Z		
<30 vs. 30-39	152.2	182	283	3.799		
<30 vs. 40-49	287.1	182	365	7.505		
<30 vs. 50-59	380.3	182	377	9.993		
<30 vs. > 60	497.4	182	253	12.14		
30-39 vs. 40-49	134.9	283	365	4.041		
30-39 vs. 50-59	228.1	283	377	6.878		
30-39 vs. > 60	345.2	283	253	9.464		
40-49 vs. 50-59	93.13	365	377	3.008		
40-49 vs. > 60	210.3	365	253	6.097		
50-59 vs. > 60	117.2	377	253	3.420		

Mann-Whitney test		IgG	Mann-Whitney test		Neutralisering
Table Analyzed		Personale køn	Table Analyzed		Personale køn
Column C		Mand	Column D		Mand
vs.		vs.	vs.		vs.
Column A		Kvinde	Column B		Kvinde
Mann Whitney test			Mann Whitney test		
P value		0.0058	P value		0.0017
Exact or approximate P value?		Approximate	Exact or approximate P value?		Approximate
P value summary		**	P value summary		**
Significantly different (P < 0.05)?		Yes	Significantly different (P < 0.05)?		Yes
One- or two-tailed P value?		Two-tailed	One- or two-tailed P value?		Two-tailed
Sum of ranks in column A,C		912595 , 153935	Sum of ranks in column B,D		914843 , 151687
Mann-Whitney U		126674	Mann-Whitney U		124426
Difference between medians			Difference between medians		
Median of column A		2289, n=1227	Median of column B		54.30, n=1227
Median of column C		1875, n=233	Median of column D		46.66, n=233
Difference: Actual		-414.0	Difference: Actual		-7.640
Difference: Hodges-Lehmann		-372.5	Difference: Hodges-Lehmann		-6.810

Bilag 3: Kruskal-Wallis Mann-Whitney test af det serologiske respons patienter

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgG				
Number of families		1				
Number of comparisons per family		6				
Alpha		0.05				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-728.0	Yes	****	<0.0001	A-E	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 præ-immun.	-1057	Yes	****	<0.0001	A-I	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 præ-immun.	-1410	Yes	****	<0.0001	A-M	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 præ-immun.	-329.4	Yes	***	0.0004	E-I	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 præ-immun.	-681.6	Yes	****	<0.0001	E-M	
Dag 0 præ-immun. vs. Uge 3 præ-immun	-352.2	Yes	*	0.0124	I-M	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	703.4	1431	-728.0	1055	1055	27.90
Dag 0 naiv vs. Dag 0 præ-immun.	703.4	1761	-1057	1055	55	12.76
Dag 0 naiv vs. Uge 3 præ-immun.	703.4	2113	-1410	1055	55	17.00
Uge 3 naiv vs. Dag 0 præ-immun.	1431	1761	-329.4	1055	55	3.974
Uge 3 naiv vs. Uge 3 præ-immun.	1431	2113	-681.6	1055	55	8.222
Dag 0 præ-immun. vs. Uge 3 præ-immun	1761	2113	-352.2	55	55	3.081

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgM				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-443.5	Yes	****	<0.0001	B-F	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-759.3	Yes	****	<0.0001	B-J	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-941.7	Yes	****	<0.0001	B-N	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-315.8	Yes	**	0.0021	F-J	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-498.3	Yes	****	<0.0001	F-N	
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	-182.5	No	ns	0.8037	J-N	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	857.6	1301	-443.5	1055	1055	15.95
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	857.6	1617	-759.3	1055	55	8.597
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	857.6	1799	-941.7	1055	55	10.66
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	1301	1617	-315.8	1055	55	3.576
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	1301	1799	-498.3	1055	55	5.642
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	1617	1799	-182.5	55	55	1.499

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgA				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-589.7	Yes	****	<0.0001	C-G	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-1002	Yes	****	<0.0001	C-K	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-1344	Yes	****	<0.0001	C-O	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-412.3	Yes	****	<0.0001	G-K	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-754.4	Yes	****	<0.0001	G-O	
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	-342.0	Yes	*	0.0252	K-O	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	772.2	1362	-589.7	1055	1055	21.62
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	772.2	1774	-1002	1055	55	11.56
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	772.2	2116	-1344	1055	55	15.51
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	1362	1774	-412.3	1055	55	4.759
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	1362	2116	-754.4	1055	55	8.706
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	1774	2116	-342.0	55	55	2.863

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		Neutralisering				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	6					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	-537.8	Yes	****	<0.0001	D-H	
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-1124	Yes	****	<0.0001	D-L	
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-1324	Yes	****	<0.0001	D-P	
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	-586.3	Yes	****	<0.0001	H-L	
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	-785.8	Yes	****	<0.0001	H-P	
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	-199.4	No	ns	0.4795	L-P	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Dag 0 naiv vs. Uge 3 naiv	794.3	1332	-537.8	1055	1055	20.68
Dag 0 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	794.3	1918	-1124	1055	55	13.61
Dag 0 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	794.3	2118	-1324	1055	55	16.02
Uge 3 naiv vs. Dag 0 prae-immun.	1332	1918	-586.3	1055	55	7.098
Uge 3 naiv vs. Uge 3 prae-immun.	1332	2118	-785.8	1055	55	9.512
Dag 0 prae-immun. vs. Uge 3 prae-immun	1918	2118	-199.4	55	55	1.751

Kruskal-Wallis test						
Multiple comparisons		IgG				
Number of families	1					
Number of comparisons per family	10					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
<30 vs. 30-39	-36.67	No	ns	>0.9999	A-C	
<30 vs. 40-49	40.59	No	ns	>0.9999	A-E	
<30 vs. 50-59	105.2	No	ns	>0.9999	A-G	
<30 vs. > 60	194.6	No	ns	0.2374	A-I	
30-39 vs. 40-49	77.27	No	ns	>0.9999	C-E	
30-39 vs. 50-59	141.9	Yes	*	0.0397	C-G	
30-39 vs. > 60	231.3	Yes	****	<0.0001	C-I	
40-49 vs. 50-59	64.63	No	ns	0.6944	E-G	
40-49 vs. > 60	154.0	Yes	****	<0.0001	E-I	
50-59 vs. > 60	89.38	Yes	**	0.0021	G-I	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
<30 vs. 30-39	701.3	737.9	-36.67	14	51	0.3813
<30 vs. 40-49	701.3	660.7	40.59	14	122	0.4513
<30 vs. 50-59	701.3	596.0	105.2	14	234	1.200
<30 vs. > 60	701.3	506.7	194.6	14	689	2.261
30-39 vs. 40-49	737.9	660.7	77.27	51	122	1.454
30-39 vs. 50-59	737.9	596.0	141.9	51	234	2.880
30-39 vs. > 60	737.9	506.7	231.3	51	689	5.000
40-49 vs. 50-59	660.7	596.0	64.63	122	234	1.816
40-49 vs. > 60	660.7	506.7	154.0	122	689	4.919
50-59 vs. > 60	596.0	506.7	89.38	234	689	3.706

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons						
	Neutralisering					
Number of families	1					
Number of comparisons per family	10					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
< 30 vs. 30-39	9.331	No	ns	>0.9999	B-D	
< 30 vs. 40-49	34.05	No	ns	>0.9999	B-F	
< 30 vs. 50-59	132.9	No	ns	>0.9999	B-H	
< 30 vs. > 60	197.6	No	ns	0.2027	B-J	
30-39 vs. 40-49	24.72	No	ns	>0.9999	D-F	
30-39 vs. 50-59	123.6	No	ns	0.1118	D-H	
30-39 vs. > 60	188.2	Yes	***	0.0004	D-J	
40-49 vs. 50-59	98.88	Yes	*	0.0497	F-H	
40-49 vs. > 60	163.5	Yes	****	<0.0001	F-J	
50-59 vs. > 60	64.63	No	ns	0.0673	H-J	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
< 30 vs. 30-39	710.3	701.0	9.331	14	51	0.09810
< 30 vs. 40-49	710.3	676.3	34.05	14	122	0.3827
< 30 vs. 50-59	710.3	577.4	132.9	14	234	1.533
< 30 vs. > 60	710.3	512.8	197.6	14	689	2.321
30-39 vs. 40-49	701.0	676.3	24.72	51	122	0.4702
30-39 vs. 50-59	701.0	577.4	123.6	51	234	2.537
30-39 vs. > 60	701.0	512.8	188.2	51	689	4.114
40-49 vs. 50-59	676.3	577.4	98.88	122	234	2.809
40-49 vs. > 60	676.3	512.8	163.5	122	689	5.281
50-59 vs. > 60	577.4	512.8	64.63	234	689	2.710

Mann-Whitney test		IgG	Mann-Whitney test		Neutralisering
Table Analyzed		Patient køn	Table Analyzed		Patient køn
Column C		Mand	Column D		Mand
vs.		vs.	vs.		vs.
Column A		Kvinde	Column B		Kvinde
Mann Whitney test			Mann Whitney test		
P value		0.2304	P value		0.0735
Exact or approximate P value?		Approximate	Exact or approximate P value?		Approximate
P value summary		ns	P value summary		ns
Significantly different (P < 0.05)?		No	Significantly different (P < 0.05)?		No
One- or two-tailed P value?		Two-tailed	One- or two-tailed P value?		Two-tailed
Sum of ranks in column A,C		295772 , 320833	Sum of ranks in column B,D		298798 , 317808
Mann-Whitney U		147078	Mann-Whitney U		144053
Difference between medians			Difference between medians		
Median of column A		582.4, n=521	Median of column B		26.39, n=521
Median of column C		429.7, n=589	Median of column D		19.02, n=589
Difference: Actual		-152.7	Difference: Actual		-7.370
Difference: Hodges-Lehmann		0.000	Difference: Hodges-Lehmann		0.000

Bilag 4: Kruskal-Wallis test af det serologisk personale sammenlignet med patienter

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons	IgG				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank d	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 naiv	-1465	Yes	****	<0.0001	A-E
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Dag 0 præ-immun.	-2198	Yes	****	<0.0001	A-I
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 præ-immun.	-3381	Yes	****	<0.0001	A-M
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	137.4	No	ns	0.4959	A-Q
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-2531	Yes	****	<0.0001	A-U
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 præ-immun.	-1848	Yes	****	<0.0001	A-Y
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-3554	Yes	****	<0.0001	A-AC
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Dag 0 præ-immun.	-732.9	Yes	**	0.0048	E-I
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Uge 3 præ-immun.	-1916	Yes	****	<0.0001	E-M
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	1603	Yes	****	<0.0001	E-Q
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-1065	Yes	****	<0.0001	E-U
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 præ-immun.	-383.3	No	ns	0.2001	E-Y
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-2089	Yes	****	<0.0001	E-AC
Patient Dag 0 præ-immun. vs. Patient Uge 3 præ-immun.	-1183	Yes	***	0.0003	I-M
Patient Dag 0 præ-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	2335	Yes	****	<0.0001	I-Q
Patient Dag 0 præ-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	-332.4	No	ns	>0.9999	I-U
Patient Dag 0 præ-immun. vs. Personale Dag 0 præ-immun.	349.6	No	ns	>0.9999	I-Y
Patient Dag 0 præ-immun. vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-1356	Yes	****	<0.0001	I-AC
Patient Uge 3 præ-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	3519	Yes	****	<0.0001	M-Q
Patient Uge 3 præ-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	850.6	Yes	***	0.0003	M-U
Patient Uge 3 præ-immun. vs. Personale Dag 0 præ-immun.	1533	Yes	****	<0.0001	M-Y
Patient Uge 3 præ-immun. vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-173.4	No	ns	>0.9999	M-AC
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-2668	Yes	****	<0.0001	Q-U
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 præ-immun.	-1986	Yes	****	<0.0001	Q-Y
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-3692	Yes	****	<0.0001	Q-AC
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 præ-immun.	682.0	Yes	****	<0.0001	U-Y
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-1024	Yes	****	<0.0001	U-AC
Personale Dag 0 præ-immun. vs. Personale Uge 3 præ-immun.	-1706	Yes	****	<0.0001	Y-AC

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons		IgM			
Dunn's multiple comparisons test					
	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 naiv	-1029	Yes	****	<0.0001	B-F
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Dag 0 prae-immun.	-1646	Yes	****	<0.0001	B-J
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-2016	Yes	****	<0.0001	B-N
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	610.7	Yes	****	<0.0001	B-R
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-873.2	Yes	****	<0.0001	B-V
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-890.1	Yes	****	<0.0001	B-Z
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-1446	Yes	****	<0.0001	B-AD
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Dag 0 prae-immun.	-617.1	No	ns	0.0669	F-J
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-987.3	Yes	****	<0.0001	F-N
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	1639	Yes	****	<0.0001	F-R
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	155.3	No	ns	0.2822	F-V
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	138.4	No	ns	>0.9999	F-Z
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-417.3	No	ns	0.1381	F-AD
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-370.2	No	ns	>0.9999	J-N
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	2256	Yes	****	<0.0001	J-R
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	772.4	Yes	**	0.0037	J-V
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Dag 0 prae-immun.	755.6	No	ns	0.0533	J-Z
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	199.8	No	ns	>0.9999	J-AD
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	2627	Yes	****	<0.0001	N-R
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	1143	Yes	****	<0.0001	N-V
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Dag 0 prae-immun.	1126	Yes	***	0.0001	N-Z
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	570.0	No	ns	0.5366	N-AD
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-1484	Yes	****	<0.0001	R-V
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-1501	Yes	****	<0.0001	R-Z
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-2056	Yes	****	<0.0001	R-AD
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-16.85	No	ns	>0.9999	V-Z
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-572.6	Yes	**	0.0027	V-AD
Personale Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-555.7	No	ns	0.1523	Z-AD

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons	IgA				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 naiv	-1286	Yes	****	<0.0001	C-G
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Dag 0 pr�-immun.	-2115	Yes	****	<0.0001	C-K
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 pr�-immun.	-2882	Yes	****	<0.0001	C-O
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	660.2	Yes	****	<0.0001	C-S
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-1242	Yes	****	<0.0001	C-W
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	-1090	Yes	****	<0.0001	C-AA
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-2793	Yes	****	<0.0001	C-AE
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Dag 0 pr�-immun.	-828.9	Yes	***	0.0006	G-K
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Uge 3 pr�-immun.	-1596	Yes	****	<0.0001	G-O
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	1946	Yes	****	<0.0001	G-S
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	43.68	No	ns	>0.9999	G-W
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	195.7	No	ns	>0.9999	G-AA
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-1507	Yes	****	<0.0001	G-AE
Patient Dag 0 pr�-immun. vs. Patient Uge 3 pr�-immun.	-766.9	No	ns	0.1236	K-O
Patient Dag 0 pr�-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	2775	Yes	****	<0.0001	K-S
Patient Dag 0 pr�-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	872.5	Yes	***	0.0002	K-W
Patient Dag 0 pr�-immun. vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	1025	Yes	***	0.0003	K-AA
Patient Dag 0 pr�-immun. vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-678.4	No	ns	0.1048	K-AE
Patient Uge 3 pr�-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	3542	Yes	****	<0.0001	O-S
Patient Uge 3 pr�-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	1639	Yes	****	<0.0001	O-W
Patient Uge 3 pr�-immun. vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	1791	Yes	****	<0.0001	O-AA
Patient Uge 3 pr�-immun. vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	88.52	No	ns	>0.9999	O-AE
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-1903	Yes	****	<0.0001	S-W
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	-1751	Yes	****	<0.0001	S-AA
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-3453	Yes	****	<0.0001	S-AE
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 pr�-immun.	152.0	No	ns	>0.9999	W-AA
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-1551	Yes	****	<0.0001	W-AE
Personale Dag 0 pr�-immun. vs. Personale Uge 3 pr�-immun.	-1703	Yes	****	<0.0001	AA-AE

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons	Neutralisering				
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 naiv	-1237	Yes	****	<0.0001	D-H
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Dag 0 prae-immun.	-2724	Yes	****	<0.0001	D-L
Patient Dag 0 naiv vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-3317	Yes	****	<0.0001	D-P
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	-26.37	No	ns	>0.9999	D-T
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-2061	Yes	****	<0.0001	D-X
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-2415	Yes	****	<0.0001	D-AB
Patient Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-3401	Yes	****	<0.0001	D-AF
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Dag 0 prae-immun.	-1487	Yes	****	<0.0001	H-L
Patient Uge 3 naiv vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-2080	Yes	****	<0.0001	H-P
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 naiv	1211	Yes	****	<0.0001	H-T
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-824.3	Yes	****	<0.0001	H-X
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-1178	Yes	****	<0.0001	H-AB
Patient Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-2164	Yes	****	<0.0001	H-AF
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Patient Uge 3 prae-immun.	-592.7	No	ns	0.8094	L-P
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	2698	Yes	****	<0.0001	L-T
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	662.8	Yes	*	0.0198	L-X
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Dag 0 prae-immun.	309.5	No	ns	>0.9999	L-AB
Patient Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-676.9	No	ns	0.1141	L-AF
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Dag 0 naiv	3290	Yes	****	<0.0001	P-T
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Uge 3 naiv	1255	Yes	****	<0.0001	P-X
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Dag 0 prae-immun.	902.2	Yes	**	0.0036	P-AB
Patient Uge 3 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-84.23	No	ns	>0.9999	P-AF
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 naiv	-2035	Yes	****	<0.0001	T-X
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-2388	Yes	****	<0.0001	T-AB
Personale Dag 0 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-3375	Yes	****	<0.0001	T-AF
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Dag 0 prae-immun.	-353.3	No	ns	0.3645	X-AB
Personale Uge 3 naiv vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-1340	Yes	****	<0.0001	X-AF
Personale Dag 0 prae-immun. vs. Personale Uge 3 prae-immun.	-986.4	Yes	****	<0.0001	AB-AF

Bilag 5: Wilcoxon test af IgG (mucosalt slimhinde respons)

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	<0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	4754 , -602.0
Sum of signed ranks (W)	4152
Number of pairs	109
Number of ties (ignored)	6
Median of differences	
Median	617.0
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.3782
P value (one tailed)	<0.0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes

Bilag 6: Wilcoxon test af IgA (mucosalt slimhinde respons)

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.9476
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	1476 , -1450
Sum of signed ranks (W)	26.00
Number of pairs	109
Number of ties (ignored)	33
Median of differences	
Median	0.000
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.2130
P value (one tailed)	0.0131
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes

Bilag 7: Wilcoxon test af IgM (mucosalt slimhinde respons)

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0514
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	1492 , -854.5
Sum of signed ranks (W)	637.0
Number of pairs	109
Number of ties (ignored)	41
Median of differences	
Median	0.000
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0.3109
P value (one tailed)	0.0005
P value summary	***
Was the pairing significantly effective?	Yes

Bilag 8: Korrelationstest Spearman Rank IgG (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)

Spearman r	
r	0.5511
95% confidence interval	0.3570 to 0.6996
P value	
P (two-tailed)	<0.0001
P value summary	****
Exact or approximate P value?	Approximate
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	
	70

Bilag 9: Korrelationstest Spearman Rank IgA (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)

Spearman r	
r	0.2705
95% confidence interval	0.03089 to 0.4807
P value	
P (two-tailed)	0.0235
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Approximate
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	
	70

Bilag 10: Korrelationstest Spearman Rank IgM (serologisk versus mucosalt slimhinde respons)

Spearman r	
r	0.2998
95% confidence interval	0.06270 to 0.5049
P value	
P (two-tailed)	0.0117
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Approximate
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	
	70