

FORUM DIAGNOSTICUM

PRODIA DIAGNOSTICS EDUCATIONAL SERVICES



VAKSIN COVID-19 DAN PEMERIKSAAN LABORATORIUM PENUNJANG SETELAH VAKSINASI

Ardian Susanto



PENDAHULUAN

Vaksin diketahui dapat menyelamatkan jutaan nyawa setiap tahun. Vaksin bekerja dengan melatih dan mempersiapkan pertahanan alami tubuh yaitu sistem kekebalan untuk mengenali dan melawan virus dan bakteri tertentu. Setiap jenis vaksin untuk COVID-19 bekerja secara berbeda untuk memasukkan antigen, yang merupakan ciri unik virus SARS-CoV-2, ke dalam tubuh. Antigen memicu respons imun spesifik dan respons ini membangun memori imun, sehingga tubuh dapat melawan SARS-CoV-2 di masa mendatang. Diharapkan setelah vaksinasi, jika tubuh terpapar kuman penyebab penyakit tersebut, maka tubuh dapat segera melawan sehingga mencegah timbulnya penyakit, atau keparahan berlanjut (1).

Pemahaman hubungan antara imunitas terukur dan perlindungan klinis dari infeksi SARS-CoV-2 sangat diperlukan untuk merencanakan langkah selanjutnya dalam program

vaksin COVID-19. Saat ini terdapat delapan vaksin yang telah dikembangkan dan memasuki uji klinis fase 4, dan 8 jenis vaksin ini telah mendapatkan izin penggunaan darurat pada uji klinis fase 3, yaitu: 1) CoronaVac, vaksin SARS-CoV-2 yang diinaktivasi (sel vero) produk dari Sinovac Research and Development Co., Ltd; 2) BBIBP-CorV, vaksin SARS-CoV-2 yang diinaktivasi (sel vero), produk dari Sinopharm dan China National Biotec Group Co serta Beijing Institute of Biological Products; 3) ChAdOx1-S - (AZD1222), Viral vector (Non-replicating) produk dari AstraZeneca dan University of Oxford; 4) Recombinant novel coronavirus vaccine (Adenovirus type 5 vector), Viral vector (Non-replicating) produk dari CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology; 5) Ad26. COV2.S, Viral vector (Non-replicating), produk dari Janssen Pharmaceutical 6) mRNA-127, vaksin berbasis RNA, produk dari Moderna dan National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID); 7) BNT162b2 (3 LNP-mRNAs), juga dikenal sebagai "Comirnaty", vaksin berbasis RNA, produk dari Pfizer/BioNTech dan Fosun Pharma; 8) mRNA-1273.351, Vaksin

berbasis mRNA yang dienkapsulasi nanopartikel lipid (LNP) yang mengkodekan protein S yang distabilkan dengan prefusi penuh dari varian SARS-CoV-2 B.1.351, produk dari Moderna dan *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID). Kemungkinan besar tidak akan ada vaksin tunggal yang mendominasi, perkembangan keragaman platform dan teknologi menawarkan kelebihan yang berbeda relevansinya dalam konteks epidemiologi yang berbeda. Kolaborasi dan pendekatan standar untuk menilai titik akhir kemanjuran yang berbeda akan menjadi penting untuk memungkinkan perbandingan yang bermakna dan memastikan bahwa vaksin yang digunakan mempunyai efikasi proteksi terhadap infeksi SARS-CoV 2, atau paling tidak terhadap keparahan penyakit. Studi farmakovigilans yang didukung dengan baik oleh semua pihak harus dilakukan, sehingga dapat memberikan parameter yang lebih mudah untuk menentukan efek proteksi terhadap penyebaran COVID-19. Vaksin yang aman dan efektif akan menjadi pengubah permainan. Tetapi untuk saat ini protokol kesehatan tetap harus dijalankan, karena masih belum jelas sejauh mana vaksin dapat melindungi tidak hanya dari penyakit tetapi juga terhadap infeksi dan penularannya (2).

Vaksin COVID-19

Virus zoonosis merupakan ancaman besar bagi kesehatan dan ekonomi global. Pada wabah *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) subtype H5N1 yang didiagnosis di Hong Kong pada tahun 1997, dengan 18 kasus pada manusia mengakibatkan enam kematian. Ini adalah wabah virus influenza A pertama yang diketahui akibat penularan langsung virus flu burung dari ayam ke manusia tanpa reservoir perantara seperti babi. Wabah ini meningkatkan kesadaran akan risiko pandemi yang menghancurkan, dan menunjukkan bahwa lebih banyak sumber daya harus dialihkan ke perencanaan kesiapsiagaan pandemi. Banyak yang menganggap ini sebagai tanggapan berlebihan terhadap wabah kecil, yang bertujuan untuk memperoleh lebih banyak dana penelitian, terutama ketika bertahun-tahun berlalu tanpa pandemi H5N1, meskipun peredaran HPAI H5N1 yang meluas dan terus berlanjut pada unggas dengan kontak langsung rutin ke manusia, menghasilkan lebih dari 850 kasus manusia yang terinfeksi dan lebih dari 450 kematian hingga saat ini. Munculnya *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV) pada tahun 2002 membuat kewaspadaan meningkat untuk sementara waktu, tetapi pandemi ini dapat diatasi melalui pelacakan kontak model lama dan prosedur isolasi setelah menyebabkan >8.000 kasus di 27 negara. Selanjutnya, pandemi H1N1 2009 ternyata relatif ringan, dengan angka kematian kasus yang rendah. Epidemi virus Ebola di Afrika Barat pada 2013-2016 merupakan titik balik. Sementara wabah virus Ebola terbesar sebelumnya telah mengakibatkan beberapa ratus kasus di

daerah terbatas, epidemi ini mengakibatkan hampir 30.000 kasus di sepuluh negara dan membutuhkan waktu lebih dari tiga tahun untuk pengendaliannya (3,4).

Teknik bioinformatika cepat telah digunakan untuk menganalisis dinamika mutasi SARS-CoV-2, dan mengungkap bagaimana penyebarannya. Tingkat mutasi virus RNA, seperti virus influenza dan HIV-1, lebih tinggi daripada virus DNA. Namun, analisis keragaman genetik dari genom SARS-CoV-2 menunjukkan tingkat mutasi yang jauh lebih rendah daripada pada virus RNA lainnya. Hal ini menjanjikan untuk pengembangan vaksin, untuk menimbulkan imunitas yang diinduksi oleh vaksin yang menargetkan antigen spesifik yang berdampak pada netralisasi virus (5).

Para ilmuwan mempercepat pengembangan vaksin yang potensial, dalam kurun waktu kurang lebih 6 bulan setelah penemuan SARS-CoV-2, kandidat vaksin telah banyak dikembangkan, dengan banyak pilihan platform vaksin. Kandidat Vaksin dihasilkan dengan menggunakan teknologi yang ada dan telah diterapkan untuk mengembangkan vaksin melawan penyakit menular lainnya maupun dengan teknologi yang baru diterapkan secara luas pada kondisi pandemi saat ini. Dalam uji klinis, menetapkan titik akhir imunologi yang sesuai memainkan peran kunci dalam mengevaluasi kemanjuran dan keamanan kandidat vaksin. Informasi terbaru tentang fitur imunologi dari individu yang pernah atau belum terpapar SARS-CoV-2 terus memandu strategi pengembangan vaksin yang efektif (6).

Banyak titik akhir yang berbeda digunakan dalam penelitian vaksin untuk menentukan kemanjuran tergantung pada patogen, konsekuensi infeksi, dan dinamika penularan. Seringkali, data hasil dari *Randomized Control clinical trial* (RCT) disajikan sebagai penurunan kejadian penyakit secara proporsional antara peserta yang divaksinasi dan peserta kontrol untuk menghitung efikasi vaksin. Hasil mungkin termasuk pencegahan infeksi (yaitu, menilai kemampuan sistem imun untuk memberikan proteksi terhadap penyakit), keparahan penyakit klinis yang dihasilkan (yaitu, menilai kemampuan sistem imun yang berdampak pada perjalanan penyakit), atau durasi infektivitas. RCT tersebut merupakan skenario kasus terbaik efikasi vaksin dalam kondisi ideal dalam populasi tertentu dan memberikan data kunci yang diperlukan untuk lisensi vaksin. Namun, efikasi vaksin tidak selalu memprediksi keefektifan vaksinasi, di mana perlindungan yang dihasilkan oleh vaksin yang diberikan secara non-acak dalam kondisi lapangan banyak faktor yang mempengaruhi. RCT mungkin tidak memprediksi

perlindungan yang diperoleh secara tidak langsung dari kekebalan kelompok (*herd immunity*) setelah penyebaran vaksin yang meluas. Demikian pula, RCT yang dilakukan dalam kelompok usia atau pengaturan geografis tertentu mungkin tidak memprediksi keefektifan jika vaksin digunakan secara lebih luas. Ada kemungkinan bahwa platform vaksin alternatif atau penambahan bahan pembantu diperlukan untuk imunogenisitas yang memadai pada kelompok usia yang lebih tua, seperti pada vaksin influenza. Untuk alasan ini, studi prospektif tentang efektivitas vaksin pasca lisensi secara rutin diperlukan (6).

Hasil dari infeksi SARS-CoV-2 pada individu bersifat heterogen dan bergantung pada banyak variabel, termasuk usia, jenis kelamin, etnis, dan penyakit penyerta. Pada tingkat individu, konsekuensi infeksi dapat berkisar dari keadaan *paucisymptomatic* hingga masuk rumah sakit, kebutuhan untuk bantuan pernafasan, dan kematian. Dinamika penularan SARS-CoV-2 belum sepenuhnya dipahami tetapi kemampuan individu yang terinfeksi untuk menularkan infeksi ketika asimtomatik atau dalam periode pra-gejala menunjukkan bahwa strategi pengendalian infeksi yang hanya berfokus pada pencegahan penularan dari individu yang bergejala tidak akan cukup untuk menghentikan penularan SARS-CoV-2 (5).

Efikasi vaksin selama pandemi SARS-CoV-2 sangat kompleks dan ada banyak skenario potensial setelah penyebaran. Kemampuan vaksin untuk melindungi dari penyakit parah dan kematian adalah titik akhir efikasi yang paling penting, karena perawatan di rumah sakit dan perawatan kritis menempatkan beban terbesar pada sistem perawatan kesehatan. Namun, efek menguntungkan dari vaksin tersebut pada suatu populasi hanya dapat diamati jika vaksin tersebut manjur pada orang dewasa yang lebih tua (misalnya, sekitar >60 tahun) dan ada distribusi vaksin yang luas, termasuk kepada orang-orang yang paling rentan terhadap COVID-19. Cakupan yang tinggi di antara kelompok yang berisiko tinggi terkena COVID-19 yang parah akan memiliki efek terbesar terhadap titik akhir penyakit. Alternatifnya, vaksin yang tidak memengaruhi perjalanan klinis penyakit, tetapi mengurangi penularan SARS-CoV-2, masih bisa menjadi intervensi yang berharga pada tingkat populasi (6).

Saat ini, terdapat lebih dari 100 kandidat vaksin SARS-CoV-2 yang sedang dikembangkan. WHO menerbitkan daftar vaksin yang diperbarui secara berkala dalam pengembangan. Platform yang digunakan untuk menghasilkan kandidat vaksin dirangkum dalam Tabel 1. Sebagian besar vaksin kandidat menargetkan protein membran permukaan S, yang terlibat

dalam pengikatan reseptor, fusi membran, dan masuk ke sel inang (8).

Tabel 1. Platform vaksin COVID-19 (8)

Platform	Candidate vaccines (no. and %)
PS	Protein subunit 32 31%
VVnr	Viral Vector (non-replicating) 16 16%
DNA	DNA 10 10%
IV	Inactivated Virus 16 16%
RNA	RNA 16 16%
VVr	Viral Vector (replicating) 2 2%
VLP	Virus Like Particle 5 5%
VVr + APC	VVr + Antigen Presenting Cell 2 2%
LAV	Live Attenuated Virus 2 2%
VVnr + APC	VVnr + Antigen Presenting Cell 1 1%

Struktur Virus SARS COV-2

Pengenalan struktur virus secara menyeluruh merupakan tahap awal pembuatan vaksin, untuk mengetahui potensi imunogenitas antigen masing-masing epitop dari virus yang dapat memberikan efek perlindungan. Coronavirus termasuk dalam keluarga *Coronaviridae* yang dibagi menjadi empat kelas yaitu alpha- coronavirus dan beta-coronavirus yang menginfeksi mamalia, serta gamma-coronavirus dan delta-coronavirus yang terutama menginfeksi burung. Saat ini, tujuh jenis virus corona telah diidentifikasi menular pada manusia (9). Empat dari jenis ini (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, dan HCoV-HKU1) telah ditetapkan sebagai virus corona pada manusia dan telah menginfeksi individu di seluruh dunia. Tiga jenis lainnya (MERS-CoV, SARS-CoV, dan SARS-CoV-2) menyebabkan penyakit pernapasan akut yang masing-masing dikenal sebagai MERS, SARS, dan COVID-19. Karena peredaran virus korona umum dalam populasi manusia, sel T reaktif SARS-CoV-2 telah diamati pada 40%-60% individu yang tidak terpapar Coronavirus. Secara struktural adalah virus pleomorfik, yang diselubungi dengan pinggir khas proyeksi yang terdiri dari protein S di permukaannya. Virus ini dilengkapi dengan genom ssRNA sense positif, dengan protein nukleokapsid (N) yang membentuk nukleokapsid heliks. Genom dibatasi dan poladenilasi. Analisis genetik SARS-CoV-2 dan SARS-CoV telah mengungkapkan 79% kesamaan dengan total 380 substitusi asam amino yang terkondensasi terutama di dalam gen NSP. Dari substitusi ini, terdapat 27 substitusi asam amino pada protein S dominan imun sedangkan 102 dan 61 substitusi asam amino ditemukan pada NSP3 dan NSP2. Sedangkan, NSP7, NSP13, protein E, dan beberapa protein tambahan tidak memiliki substitusi asam amino. SARS-CoV dan SARS-CoV-2 mengikat reseptor inang yang sama, hACE2, untuk masuk ke dalam sel tetapi SARS-CoV-2 mengikat reseptor dengan afinitas yang lebih kuat daripada SARS-CoV (10).

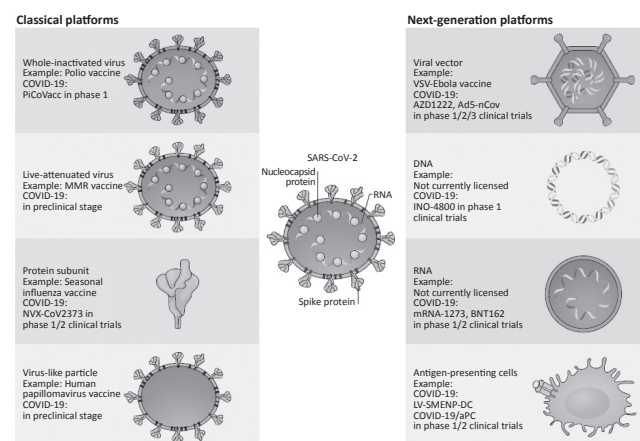
Pada perkembangan platform vaksin yang digunakan, tidak hanya informasi struktur virus, informasi genom virus diperlukan untuk pembuatan vaksin generasi baru, dengan keuntungan proses pembuatan vaksin yang lebih aman dan dengan tingkat imunogenik yang dapat memberikan perlindungan lebih efektif. Genom SARS-CoV-2 ditranskripsikan dalam setidaknya 10 *open reading frame* (ORF). ORF1ab ditranslasikan menjadi poliprotein menjadi 16 protein non-struktural (NSPs). NSP melakukan berbagai fungsi seperti replikasi genom, mendorong pembelahan mRNA inang, penataan ulang membran, pembentukan autofagosom, pembelahan poliprotein NSP, pembatasan, tailing, metilasi, pelepasan dupleks RNA, dan lain-lain yang penting untuk siklus hidup virus. Selain itu, virus SARS-CoV-2 terdiri dari empat protein struktural yaitu protein *spike* (S), nukleokapsid (N), *envelope* (E), dan membran (M) yang dikodekan oleh ujung 3'-genom virus. Empat protein struktural glikoprotein S, merupakan protein trans-membran multi-fungsi yang besar, memainkan peran penting dari perlekatan, fusi, dan masuknya virus ke dalam sel inang. Protein S terdiri dari subunit S1 dan S2, yang selanjutnya dipecah menjadi domain fungsional yang berbeda. Subunit S1 memiliki dua domain fungsional yaitu. *N-terminal Domain* (NTD) dan *Receptor Binding Domain* (RBD) dan yang terakhir berisi *Receptor Binding Motif* (RBM). Studi *alignment* telah mengungkapkan bahwa wilayah urutan RBD terletak di antara residu 331 dan 524 protein S). Sedangkan subunit S2 memiliki tiga domain operasional yaitu *fusion peptide* (FP), *heptad repeat* (HR) 1, dan 2. Trimer protein S1 menyelaraskan dirinya di atas tangkai S2 trimerik untuk membentuk protein S yang dominan imun. Menariknya, tidak adanya situs pembelahan furin di dalam protein Spike SARS-CoV-2 merupakan penjelasan yang mungkin dari variasi patogenisitas virus. Sebuah protease serine 2 trans-membran inang, (TMPRSS2) bertanggung jawab untuk *priming* awal protein S. Virus dapat memanfaatkan TMPRSS2 dan protease sistein endosom cathepsin B dan L (CatB/L) untuk memulai masuk ke dalam sel. TMPRSS2 bertanggung jawab atas pembelahan protein S untuk mengekspos daerah FP dari subunit S2 yang bertanggung jawab untuk inisiasi entri yang dimediasi oleh endosom ke dalam sel inang. Ini menunjukkan bahwa TMPRSS2 adalah faktor inang yang penting untuk entri virus; oleh karena itu, obat yang disetujui untuk penghambatan protease ini (seperti *camostatmesylate*) dapat digunakan untuk tujuan terapeutik. SARS-CoV-2 menggunakan reseptor *human angiotensin-converting enzyme 2* (hACE2) sebagai sel target glikoprotein Spike (S-Protein). Virus korona menggunakan selubung konformasi dan pelindung glycan dari protein S untuk menghindari sel kekebalan inang. Struktur Cryo-EM telah mengungkapkan adanya dua perbedaan: konformasi tertutup dan terbuka dari trimer ektodomain

S-Protein, sebagai konsekuensi dari pembukaan struktur pada trimer apex. Diversifikasi konformasi ini diperlukan untuk pengikatan reseptor karena pembukaan trimer mengekspos RBM yang ada di antarmuka antara protomer di trimer yang tertutup (10,11).

Vaksin Platform klasik

Sebagian besar vaksin yang saat ini dilisensikan untuk digunakan oleh manusia dapat dibagi menjadi vaksin berbasis virus atau berbasis protein (Gambar 1). Vaksin berbasis virus dapat terdiri dari virus yang tidak aktif lagi yang tidak dapat menular, atau virus hidup yang dilemahkan. Karena virus yang tidak aktif secara utuh tidak mereplikasi, adjuvan diperlukan untuk menstimulasi sistem kekebalan. Vaksin virus hidup yang dilemahkan secara klasik dihasilkan dengan melewati dalam kultur sel sampai kehilangan sifat patogeniknya dan hanya menyebabkan infeksi ringan setelah injeksi. Vaksin berbasis protein dapat terdiri dari protein yang dimurnikan dari virus atau sel yang terinfeksi virus, protein rekombinan atau partikel mirip virus. Partikel mirip virus terdiri dari protein virus struktural yang diperlukan untuk membentuk partikel virus, tetapi kekurangan genom virus dan protein non-struktural. Vaksin berbasis protein memerlukan tambahan adjuvan untuk memicu respons imun yang kuat. Dua vaksin COVID-19 berdasarkan platform klasik ini sedang dalam uji klinis, satu berdasarkan virus yang tidak diaktifkan secara keseluruhan dan satu lagi terdiri dari protein rekombinan (8).

Platform vaksin klasik ini telah berkontribusi pada terobosan kesehatan masyarakat yang besar, seperti pemberantasan cacar dan vaksin untuk mencegah kanker. Namun, batasan tertentu dikaitkan dengan beberapa platform ini, yang membuatnya kurang setuju untuk produksi vaksin yang cepat dalam pandemi. Dalam kasus SARS-CoV-2, sejumlah besar



Gambar 1. Representasi skematis ditunjukkan dari platform vaksin klasik yang biasanya digunakan untuk vaksin manusia, dan platform generasi berikutnya (8).



virus perlu ditanam di bawah kondisi tingkat keamanan hayati 3 atau *Biosafety Level-3* (BSL3) untuk vaksin yang sepenuhnya tidak aktif; pengujian keamanan ekstensif diperlukan untuk memastikan virus yang dilemahkan hidup aman dan tidak mudah kembali ke *wild type*, dan beberapa protein rekombinan perlu diproduksi secara bersamaan untuk vaksin partikel mirip virus (8).

Virus Inaktif

Vaksin Inaktif merupakan metode tradisional pembuatan vaksin yang dimurnikan dari sel yang terinfeksi oleh virus. Metode manufaktur skala besar yang dilakukan pada tahun 1940-an menggunakan telur berembrio dari ayam untuk menghasilkan vaksin influenza yang tidak aktif. Cara pertama untuk membuat vaksin adalah dengan mengambil virus atau bakteri pembawa penyakit, atau yang sangat mirip dengannya, dan menonaktifkan atau mematikannya dengan menggunakan bahan kimia, panas atau radiasi. Vaksin SARS-CoV-2 inaktif telah dikembangkan dengan cepat, dan beberapa diantaranya sudah mendapatkan persetujuan darurat untuk digunakan. Masalah teknis yang umum untuk memproduksi vaksin yang tidak aktif adalah pemilihan jenis virus yang sesuai. Salah satu Vaksin yang tidak aktif, adalah CoronaVac, berasal dari strain CN2 dengan bahan adjuvan alum menunjukkan kemampuan netralisasi yang luas terhadap SARS-CoV-2 dalam studi praklinis. Saat ini, tiga dari vaksin yang tidak aktif sedang dalam uji klinis fase III dan sudah mendapat izin penggunaan darurat oleh WHO (5,8).

Sinovac Biotech di Beijing, Cina, telah menguji bentuk SARS-CoV-2 dalam bentuk tidak aktif (PiCoVacc) yang diproduksi dalam sel Vero dan dinonaktifkan menggunakan β -propiolakton. Vaksin ini diujikan pada mencit, tikus, dan *non-human primates* (NHP) dalam dua dosis (3 dan 6 μ g). PiCoVacc dilaporkan menginduksi antibodi pada model hewan praklinis ini yang mampu menetralkan 10 strain yang mewakili SARS-CoV-2. Selain itu, perlindungan parsial sampai lengkap diamati pada kera setelah tiga imunisasi dengan PiCoVacc melawan tantangan SARS-CoV-2. Khususnya, penilaian histopatologi menunjukkan tidak ada perubahan patologi pada organ vital kera yang divaksinasi. Lebih lanjut, berbeda dengan virus hidup, vaksin virus yang dilemahkan tidak mengakibatkan perubahan persen pada limfosit (CD3+, CD4+, atau CD8+) atau badai sitokin yang merupakan penyebab utama kematian pada individu yang terinfeksi SARS-CoV-2. Vaksin lain yang tidak aktif, BBIBP-CorV, yang dikembangkan oleh Sinopharm, Cina, juga dinilai efikasinya pada beberapa model hewan, termasuk NHP. Vaksin ini menghasilkan titer antibodi penetral yang kuat bahkan dengan pengujian dosis terendah (2 μ g). Selain itu, BBIBP-CorV mampu memberikan

perlindungan pada kera tanpa *antibody-dependent enhancement* [45]. Kandidat vaksin Sinovac (NCT04582344) dan Sinopharm (NCT04560881) saat ini sedang dalam sudah mendapatkan izin penggunaan darurat oleh WHO dan telah dilakukan program vaksinasi pada beberapa negara. Meskipun sangat menggembirakan bahwa vaksin yang tidak aktif ini dapat menimbulkan respons humoral yang diinginkan, inaktivasi total virus akan sangat penting untuk keamanan vaksin pada manusia (5,8,12).

Virus Hidup yang dilemahkan

Pengembangan vaksin menggunakan virus yang dilemahkan atau dinonaktifkan telah menjadi pendekatan tradisional selama beberapa dekade, termasuk campak dan iterasi pertama dari vaksin polio oleh Salk dan Sabin. Vaksin virus hidup yang dilemahkan dilakukan baik dengan serial *passaging* dalam sel hewan/manusia atau dengan mengubah kode genetik virus untuk melemahkan virus. Virus juga dapat dinonaktifkan menggunakan bahan kimia seperti formaldehida dan panas. Vaksin virus hidup biasanya sangat imunogenik; oleh karena itu, satu dosis sering cukup untuk menghasilkan respons imun yang substansial; namun, selalu ada risiko tinggi terhadap strain yang dilemahkan menjadi strain patogen (12).

Protein SubUnit

Komponen protein dari patogen yang ditargetkan yang dapat merangsang respon perlindungan dianggap berguna untuk vaksin subunit. Biasanya, subunit vaksin merupakan protein permukaan atau struktural. Untuk kandidat vaksin virus, protein lonjakan yang diperlukan untuk perlekatan virus dan masuk ke sel inang sering ditargetkan dengan alasan untuk memperoleh tanggapan yang dapat memblokir masuknya virus. Protein spike (S) SARS-CoV-2 terdiri dari subunit S1 yang meliputi- N-Terminal Domain (NTD), RBD, dan C-Terminal Domain (CTD), dan subunit S2 yang mengandung *fusion peptide*, *domain transmembrane*, dan *cytoplasmic tail*. Spike protein S berkumpul sebagai homotrimer dan sangat terglykosilasi. Varian antigen lonjakan SARS-CoV-2 telah dianalisis dalam studi praklinis pada kelinci oleh Ravichandran *et al.* Pada penelitian ini kelinci diimunisasi dengan *spike-ectodomain* (S1+S2), domain S1, RBD dan domain S2. Mereka mengamati bahwa semua kecuali kelompok S2 dapat menginduksi respon nAb yang kuat. Titer yang lebih tinggi dari nAbs afinitas tinggi diamati pada kelompok yang diimunisasi RBD, mendukungnya sebagai kandidat vaksin yang menjanjikan. Respon kuat yang diinduksi RBD serupa juga diamati dalam studi praklinis SARS, MERS, dan virus korona lainnya. Kandidat vaksin *full-length S-trimer* dan RBD seperti yang dikembangkan oleh Novavax (2020-004123-16) telah memasuki studi tahap 3, diikuti oleh kandidat yang dikembangkan oleh Sanofi Pasteur

(NCT04537208), Clover Biopharmacies/GSK (GlaxoSmithKline plc) (NCT04405908), Vaxine Pty Ltd. (NCT04453852), dll. Dalam uji coba Fase 1/2 dan Fase 1, terutama dengan bahan pembantu yang berbeda (7,12,13).

Virus-Like Particle

Nanopartikel mirip virus (VLP) yang meniru fitur struktural virus tetapi tanpa genom juga direncanakan untuk dievaluasi dalam uji klinis. Vaksin Medicago (NCT04450004) SARS-CoV-2 VLP (CoVLPs) yang dilengkapi dengan sistem adjuvan produk GSK sedang dalam studi Tahap 1. Demikian pula, banyak vaksin berbasis VLP lainnya sedang dalam uji praklinis. Vaksin oral non-invasif untuk SARS-CoV-2 yang dirancang oleh Vaxart, yang bertujuan untuk memunculkan respons imun mukosa, merupakan kandidat vaksin baru tambahan yang sedang disiapkan (<https://investors.vaxart.com/news-releases/news-release-details/vaxart-announces-fda-clearance-ind-application-oral-covid-19>). Adjuvan biasanya digunakan dalam formulasi vaksin berbasis protein yang mungkin mengatur hasil respon serta efikasi perlindungan vaksin (7,12,13).

Vaksin Platform Generasi Baru

Pengembangan vaksin untuk melawan COVID-19 sedang berlangsung, penting untuk menentukan apa yang diharapkan dari pengembangan vaksin ini, terutama pengembangan vaksin untuk virus yang muncul di masa depan. Vaksin harus aman dan efektif, dan tidak boleh menyebabkan peningkatan penyakit pada infeksi berikutnya, baik melalui peningkatan penyakit pernapasan terkait vaksin atau peningkatan ketergantungan antibodi. Untuk mencegah penyakit parah setelah infeksi, vaksinasi harus menghasilkan (1) penghentian total atau pengurangan penularan yang signifikan di dalam populasi dengan menginduksi *herd immunity* atau (2) pencegahan penyakit parah pada semua individu yang divaksinasi. Kedua pendekatan tersebut akan membutuhkan produksi vaksin dalam jumlah besar, yang didistribusikan ke seluruh dunia. Vaksin dosis tunggal yang tidak memerlukan rantai dingin akan berkontribusi pada jangka waktu di mana vaksinasi global berskala besar dapat dicapai. Idealnya, vaksinasi akan memicu kekebalan jangka panjang, tetapi vaksinasi tahunan dapat dilakukan berdasarkan pengalaman dengan vaksin influenza tahunan. Kampanye vaksinasi yang mendorong *herd immunity* atau melindungi individu yang divaksinasi dari penyakit parah menghadapi tantangan yang berbeda. *Herd Immunity* untuk SARS-CoV-2 akan membutuhkan vaksinasi sampai 67% dari populasi, yang merupakan rata-rata dan tidak akan mencegah kelompok individu yang rentan. Diharapkan platform vaksin baru memiliki peningkatan imunogenisitas yang lebih baik pada kelompok risiko ini dibandingkan dengan

pendekatan vaksinasi klasik, namun demikian hal ini masih harus dibuktikan pada uji klinik tahap 3 dan 4 untuk benar-benar menilai efikasinya (8).

Keuntungan utama dari vaksin generasi berikutnya adalah dapat dikembangkan berdasarkan informasi urutan material genetik saja. Jika protein virus penting untuk memberikan perlindungan dari infeksi atau penyakit, dan dengan demikian untuk dimasukkan ke dalam vaksin (yaitu, antigen vaksin), diketahui ketersediaan urutan kode untuk protein virus ini cukup untuk memulai pengembangan vaksin generasi baru, daripada harus bergantung pada kemampuan untuk membiakkan virus. Hal ini membuat platform ini sangat mudah beradaptasi dan sangat mempercepat pengembangan vaksin yang sebagian besar uji klinis vaksin COVID-19 yang saat ini sedang berlangsung melibatkan platform generasi berikutnya (Gambar 1) (8).

Vektor Virus

Vaksin vektor virus terdiri dari virus rekombinan (yaitu vektor virus), yang sering dilemahkan untuk mengurangi patogenisitasnya, di mana gen yang mengkode antigen virus telah diklon menggunakan teknik DNA rekombinan. Vaksin vektor dapat bereplikasi atau tidak bereplikasi. Vaksin vektor replikasi menginfeksi sel di mana antigen vaksin diproduksi serta vektor virus yang lebih menular yang dapat menginfeksi sel baru yang kemudian juga akan menghasilkan antigen vaksin. Vaksin vektor yang tidak mereplikasi awalnya memasuki sel dan menghasilkan antigen vaksin, tetapi tidak ada partikel virus baru yang terbentuk. Karena vaksin vektor virus menghasilkan produksi antigen endogen, baik respons imun humoral maupun seluler dirangsang. Salah satu keuntungan dari vaksin berbasis vektor virus ini adalah bahwa dosis tunggal dapat mencukupi untuk perlindungan, seperti dalam kasus vaksin Ervebo berbasis virus vesikuler-stomatitis untuk melawan virus Ebola (12).

Vaksin vektor virus rekombinan adalah salah satu vaksin SARS-CoV-2 yang paling banyak dikembangkan, dimana empat di antaranya dalam fase klinis dan beberapa di tahap pengembangan praklinis. Adenovirus tipe-5 (Ad5), Ad26, dan virus stomatitis vesikuler (VSV) adalah vektor yang biasa digunakan. Salah satunya adalah yang dikembangkan oleh CanSino Biologics, China, vaksin COVID-19 vektor Ad5 rekombinan yang mengekspresikan lonjakan glikoprotein dari SARS-CoV-2 baru-baru ini telah dinilai dalam studi non-acak Fase 1 untuk keamanan dan imunogenisitas (NCT04568811). Sebanyak 108 peserta sehat terdaftar di Wuhan, Cina, dalam kelompok usia 18-60 tahun untuk uji coba ini. Untuk mengantisipasi risiko imunogenisitas yang tidak diinginkan



dari vaksin berbasis adenovirus, vaksin tersebut diuji dalam dosis rendah, sedang dan tinggi. Semua penerima vaksin telah menginduksi antibodi anti-RBD terlepas dari dosisnya setelah 14 hari, yang mencapai puncaknya pada 28 hari setelah vaksinasi. Meskipun tidak diperiksa, antibodi terhadap epitop pada lonjakan selain RBD juga diharapkan dapat diinduksi melalui pendekatan vaksin ini. Tanggapan ini juga akan mengatur sejauh mana keberhasilan vaksin dalam fase uji klinis berikutnya. Selain itu, antibodi yang dihasilkan vaksin vektor Ad5 juga menunjukkan netralisasi in vitro dari virus SARS-CoV-2. Respon sel T dalam bentuk pelepasan IFN γ , TNF α , dan IL-2 terdeteksi dari sel CD4 $^{+}$ dan CD8 $^{+}$ T yang memuncak pada hari ke-14 pasca vaksinasi di semua kelompok dosis. Respon humoral dan yang dimediasi sel secara signifikan lebih tinggi pada kelompok dosis tinggi dibandingkan dengan kelompok dosis menengah dan rendah. Sementara itu, antibodi antigen-spesifik dan respon sel-T sebagian berkurang pada penerima yang sudah memiliki kekebalan terhadap adenovirus. Sebagian besar partisipan juga mengalami efek samping ringan hingga sedang, seperti nyeri di tempat suntikan, demam, kelelahan, sakit kepala, dan nyeri otot pasca vaksinasi. Namun, tidak ada reaksi merugikan yang dilaporkan setidaknya sampai 28 hari setelah vaksinasi (12,13).

Vaksin COVID-19 vektor-Ad26 adalah kandidat lain yang dikembangkan oleh Johnson & Johnson yang menunjukkan perlindungan dalam NHP dengan keuntungan menjadi kurang imunogenik daripada Ad5. Vaksin ChAdOx1-nCoV-19 yang diberi vektor dengan adenovirus simpanse juga telah dikembangkan oleh Universitas Oxford dan AstraZeneca. Platform yang sama digunakan untuk MERS dan tuberkulosis (TB) dengan hasil yang menjanjikan dalam uji klinis pada manusia. Tidak seperti vektor Ad5/Ad26, ChAdOx1 memiliki kekebalan yang jauh lebih sedikit pada manusia, yang merupakan penentu penting dari keefektifan platform ini. ChAdOx1-nCoV-19, memang, telah menunjukkan induksi yang kuat dari antibodi penetral dan tanggapan sel-T, dalam hubungannya dengan penurunan titer virus pada NHP. Studi Tahap 1/2 telah menunjukkan ChAdOx1-nCoV-19 aman dan juga efektif dalam menghasilkan respons seluler dan humoral. Vaksin Ad5-vectored (NCT04540419), Ad26-vectored (NCT04505722) dan ChAdOx1-nCoV-19 (NCT04540393) semuanya saat ini dalam uji klinis Fase 3. Vaksin lain berbasis VSV dan vektor virus vaksinia virus Ankara (MVA) yang dimodifikasi juga menunjukkan hasil yang menjanjikan pada model hewan praklinis (12,13).

Vaksin mRNA

Vaksin berbasis asam nukleat dapat terdiri dari DNA atau mRNA dan dapat diadaptasi dengan cepat ketika virus baru muncul, itulah sebabnya ini adalah salah satu vaksin COVID-19 pertama yang memasuki uji klinis. Vaksin DNA terdiri dari konstruksi DNA sintesis yang mengkode antigen vaksin. Untuk penyerapan konstruksi yang efisien ke dalam sel, injeksi perlu diikuti dengan elektroporasi. Setelah penyerapan ke dalam sel, antigen vaksin diekspresikan dari konstruksi DNA. Vaksin berbasis mRNA bekerja dengan prinsip yang sama seperti vaksin DNA, kecuali bahwa langkah pertama (translokasi nuklear dari konstruksi DNA dan transkripsi menjadi mRNA) dilewati. Vaksin RNA yang menggandakan diri cenderung memicu kekebalan protektif dengan menggunakan dosis yang lebih rendah, karena lebih banyak antigen vaksin yang diekspresikan per sel. Karena mRNA tidak terlalu stabil, konstruksi ini mencakup nukleosida yang dimodifikasi untuk mencegah degradasi mRNA. Molekul pembawa diperlukan untuk memungkinkan masuknya mRNA ke dalam sel, dalam hal ini nanopartikel lipid paling sering digunakan. Vaksin berbasis asam nukleat memicu respons imun humoral dan seluler, tetapi diperlukan beberapa dosis (12,13,14).

Pada masa sebelum pandemi tidak ada vaksin mRNA yang disetujui untuk digunakan manusia. Namun, studi praklinis yang dilakukan untuk vaksin influenza dan virus zika berbasis mRNA telah menunjukkan induksi respon protektif. Vaksin mRNA, mRNA-1273 untuk SARS-CoV-2 yang mengkodekan bentuk prefusi stabil dari protein Spike (S), telah dikembangkan bersama oleh para peneliti di *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) dan di Moderna (Cambridge, MA). Ini adalah vaksin mRNA pertama yang menjalani uji klinis untuk penilaian keamanan dan imunogenisitas. Konsep vaksin mRNA didukung oleh prinsip bahwa SARS-CoV-2 itu sendiri adalah virus(+) ss-RNA. Untuk memblokir interaksi virus awal dan masuknya virus yang dimediasi protein S ke dalam sel inang, mRNA spesifik protein S digunakan sebagai target vaksin dan dikirim dengan merangkul ke dalam nanopartikel lipid (LNP). Sebagai prinsip umum, vaksin mRNA diharapkan memasuki sel dan ditranslasikan menjadi protein target dalam sitoplasma sel. Setelah translasi, protein asing ini dilepaskan dari sel dan akan bertemu dengan *Antigen presenting cell* (APC), dan hasil pemrosesan pada *major histocompatibility complex* I (MHC I) selanjutnya MHC II merupakan presentasi dari protein target. Rangkaian peristiwa ini mengarah pada keterlibatan dan aktivasi sel B dan sel T untuk mengatur respons spesifik antigen humoral dan yang dimediasi sel. Sementara presentasi MHC I menyebabkan aktivasi sel CD8 $^{+}$ T spesifik antigen, presentasi MHC II memfasilitasi aktivasi sel T CD4 $^{+}$ dan sel B diikuti dengan peningkatan respons

antibodi. Selain itu, *uptake* makrofag dari antigen target yang disekresikan menghasilkan sekresi sitokin dan kemokin pro-inflamasi, mengaktifkan *innate Immun system* (12,14).

Hasil dari studi Tahap 1 untuk vaksin baru ini mengungkapkan bahwa vaksin berbasis mRNA dapat dengan aman menginduksi antibodi pengikat dan penetral virus terhadap protein S di semua penerima vaksin setelah dua dosis. Respons sel T CD4+ berbasis Th1, dan pada tingkat yang lebih rendah, respons sel T CD8+, juga diamati pada penerima vaksin. Tidak ada efek samping yang parah dari vaksin yang dilaporkan. Data keamanan dan imunogenisitas baru-baru ini telah diterbitkan untuk uji coba fase 1 mRNA-1273 pada orang dewasa muda dan tua, menilai kisaran dosis dari 25 hingga 100 µg (NCT04405076). Percobaan efikasi fase 3 yang besar (NCT04470427) mengevaluasi dosis 100 µg sudah mulai menilai lebih lanjut vaksin mRNA-1273 pada sekitar 30.000 sukarelawan dewasa. Sebagai alternatif, kandidat vaksin Pfizer dan BioNTech berdasarkan mRNA yang mengkode SARS-CoV-2 RBD yang dikomplekskan dengan nanopartikel lipid juga sedang dalam studi Tahap 3 (NCT04368728). Kandidat mRNA lain yang dikembangkan oleh CureVac (NCT04515147) dan Arcturus/Duke-NUS (*National University of Singapore*) (NCT04480957) juga berkembang pesat melalui uji coba Tahap 2 untuk penilaian (7,13).

Vaksin DNA

Belum ada vaksin DNA berlisensi yang disetujui untuk manusia, banyak kandidat vaksin DNA sedang dalam uji praklinis dan bahkan uji klinis. Setelah diekspresikan, antigen protein pelindung dapat diproses secara endogen dan disajikan oleh *antigen presenting cell* (APC) yang dikomplekskan dengan MHC. DNA yang dikirim melalui platform vaksin virus dan non-virus yang berbeda memasuki sel melalui endositosis dan memicu respons imun bawaan melalui reseptor sistem kekebalan bawaan, seperti *Toll-Like Receptor 9* (TLR9) yang ada di endosom. Vaksin DNA pengkode protein S SARS-CoV-2, INO-4800, baru-baru ini dikembangkan dan dievaluasi untuk imunogenisitas pada tikus dan marmut. Dalam pengujian praklinis ini, INO-4800 menginduksi respon imunoglobulin G (IgG) terhadap lonjakan protein setelah dosis tunggal. Selain itu, antibodi penetral virus diamati pada hewan yang diimunisasi ini dengan potensi yang ditunjukkan untuk bersaing dengan ACE2 yang mengikat protein S SARS-CoV-2. INO-4800 (NCT04336410), bersama dengan tiga vaksin DNA lainnya, saat ini sedang dalam studi Fase 1/2 dengan beberapa di studi praklinis (8,12).

Berdasarkan fitur yang sangat fleksibel dan hemat biaya dari platform vaksin DNA, serangkaian kandidat vaksin DNA prototipe berdasarkan panjang yang berbeda dari

gen penyandi Protein S SARS-CoV-2 telah dievaluasi untuk imunogenisitas dan kemanjuran pada kera rhesus melalui rute intramuskular tanpa adjuvan. Kandidat ini termasuk enam varian protein SARS-CoV-2 S berdasarkan situs pemotongan; *full-length* (S), *cytoplasmic tail deletion mutant* (S.dCT), *transmembrane domain and cytoplasmic tail deletion mutant* (S.dTM), *S1 subunit* (S1), *receptor-binding domain* (RBD), dan *prefusion stabilized ectodomain with dual proline mutation* (S.dTM.PP). Respons antibodi pengikat spesifik protein S dan antibodi penetral virus yang menunjukkan berbagai subkelas dan fungsi efektor diamati setelah meningkatkan imunisasi. Respons *antibody-dependent complement deposition* (ADCD) yang lebih tinggi juga diamati pada kelompok S dan S.dCT, sedangkan aktivasi sel natural killer (NK) yang lebih tinggi diamati pada kelompok RBD dan S.dTM.PP. Respons imun seluler yang ditargetkan ke peptida S juga terdeteksi di sebagian besar kera yang divaksinasi yang ditunjukkan oleh *enzyme-linked immune absorbent spot* (ELISPOT) IFN-γ setelah dosis penguat. Tes pewarnaan sitokin intraseluler menunjukkan induksi respons IFN-γ, sel T CD4+ dan CD8+ spesifik S, dengan respons yang relatif berkurang yang diamati pada kelompok imunogen S1 dan RBD yang lebih pendek. Respons sel T IL-4+ CD4+ dan CD8+ T spesifik S sedang diamati, menunjukkan bias terhadap Th1 dibandingkan respons imun seluler Th2. Hewan yang divaksinasi dengan SARS-CoV-2 menunjukkan penurunan RNA virus yang signifikan, menunjukkan kemanjuran perlindungan. Namun, tingkat perlindungan minimal terlihat pada kelompok S.dTM yang menyoroti pentingnya stabilisasi ektodomain prefusi untuk vaksin yang efektif. Perlindungan yang lebih optimal secara kolektif dicapai dengan imunogen S lengkap dibandingkan dengan Soluble imunogen S dan fragmen yang lebih kecil (12,13).

Platform vaksin DNA berpotensi menghasilkan respons perlindungan, akan tetapi tetap memiliki risiko *random insertion mutagenesis* akibat integrasi dalam genom inang, pembentukan antibodi anti-DNA, dan penyakit auto-imun (12).

Vaksin *Antigen presenting cell* (APC)

APC adalah komponen penting dalam respons sistem kekebalan yang dipicu oleh vaksin. Vaksinasi pasif (*adoptive immunity*), memuat APC dengan peptida yang seharusnya diproduksi dengan vaksinasi, hal ini melewati langkah pertama pada proses vaksinasi aktif. Secara tradisional, sel dendritik diambil dari individu, kemudian dimanipulasi dengan menyajikan antigen yang diinginkan, dan dimasukkan kembali ke individu yang sama. Namun cara ini membutuhkan biaya yang besar dan memerlukan waktu yang lebih lama jika vaksinasi dilakukan dalam skala besar. Hal ini mengarah pada

pengembangan sel penyaji antigen buatan, di mana sel yang diabadikan ditransduksi dengan lentivirus untuk meniru sel penyaji antigen secara efektif, seperti kasus COVID-19/aAPC. Persyaratan rantai dingin ekstra untuk vaksin berbasis sel dan prosedur infus menghambat penerapan vaksin ini dalam skala besar, terlebih lagi karena diperlukan beberapa dosis untuk respons yang efisien. Vaksin COVID-19 yang didasarkan pada semua platform generasi mendatang saat ini sedang dalam uji klinis; beberapa di antaranya telah berpindah dari fase 1 ke fase 2 atau 2/3 (8,12).

RESPON SISTEM IMUN TERHADAP SARS COV-2

Sistem Imun Bawaan (*innate Immune System*)

Sistem kekebalan secara luas dibagi menjadi sistem kekebalan bawaan dan sistem kekebalan adaptif. Meskipun sistem kekebalan adaptif dan bawaan terkait dengan cara yang penting dan kuat, mereka masing-masing terdiri dari jenis sel yang berbeda dengan tugas yang berbeda. Virus apa pun yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia harus memiliki setidaknya satu mekanisme penghindaran sistem imun. Tanpa kemampuan untuk menghindari sistem imun, virus biasanya tidak berbahaya. Memahami penghindaran kekebalan oleh virus seringkali penting untuk memahami patogenesis virus, serta memahami tantangan yang dihadapi oleh sistem imunitas adaptif dan calon vaksin. Dalam kasus SARS-CoV-2, virus ini jelas sangat efektif dalam menghindari pemicu respons imun bawaan pada fase awal, seperti interferon tipe 1 (IFN). sebagai contoh infeksi virus generik, sistem kekebalan bawaan dengan cepat mengenali infeksi dan memicu “alarm bells” dengan ekspresi IFN tipe I dan molekul terkait. Ini dapat terjadi dalam beberapa jam setelah infeksi. Respon imun bawaan mempunyai tiga fungsi atau tujuan utama: (1) pembatasan replikasi virus di dalam sel yang terinfeksi, (2) penciptaan status antivirus di lingkungan jaringan lokal, termasuk perekrutan sel efektor dari sistem imun bawaan, dan (3) *priming* respon imun

adaptif. Dua aktivitas pertama dari sistem kekebalan bawaan memperlambat replikasi dan penyebaran virus dan yang ketiga adalah kebutuhan kritis sistem imun bawaan untuk memicu respon imun adaptif. Respons imun adaptif lambat karena kebutuhan intrinsik untuk memilih dan memperluas sel spesifik virus dari kumpulan besar sel B naif dan sel T yang spesifik untuk struktur dan urutan molekul yang berbeda (masing-masing $>10^9$ sel). Respon imun adaptif membutuhkan waktu 6-10 hari setelah *priming* untuk menghasilkan sel yang cukup dalam mengendalikan infeksi virus, (Gambar 2A), hal ini karena dibutuhkan waktu untuk proliferasi dan diferensiasi sel naif menjadi sel efektor. Setelah populasi yang cukup dari sel T efektor (sel T helper dan sel T sitotoksik) dan sel B efektor (sel yang mensekresi antibodi, yang dikenal sebagai plasmablast dan sel plasma), mereka sering bekerja sama untuk secara cepat dan spesifik membersihkan sel yang terinfeksi dan virion yang bersirkulasi (16).

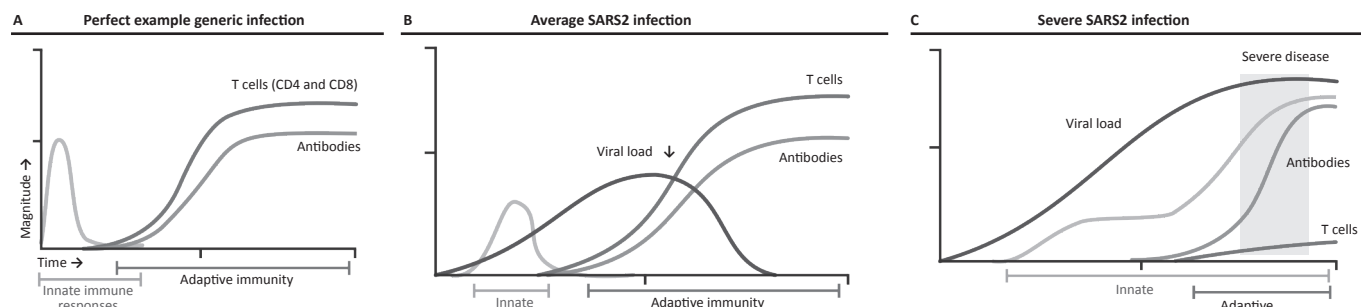
Lintasan respons imun pada COVID-19. Skema konseptual kinetika respons imun terhadap SARS-CoV-2 dalam kondisi rata-rata COVID-19 (kasus yang tidak dirawat di rumah sakit) dan COVID-19 yang parah atau fatal. Garis “kekebalan bawaan” secara khusus mengacu pada kinetika puncak sitokin dan kemokin bawaan yang terdeteksi dalam darah; respon imun bawaan terjadi secara lokal selama infeksi. “Sel T” mengacu pada sel T CD4+ dan CD8+ spesifik virus. “Antibodi” mengacu pada antibodi netralisasi spesifik virus. Panah menunjukkan titik waktu dengan perbedaan penting dalam ada atau tidak adanya tanggapan sel T dan besarnya viral load, membandingkan (B) dan (C) (16).

(A) Contoh infeksi virus generik.

(B) Rata-rata infeksi SARS-CoV-2.

(C) Infeksi SARS-CoV-2 yang parah atau fatal. Periode penyakit klinis COVID-19 yang parah diarsir abu-abu.

Pada infeksi SARS-CoV-2, virus ini sangat efektif untuk menghindari atau menunda pemicu respons imun bawaan intraseluler yang terkait dengan IFN tipe I dan tipe III yang dibuktikan secara *in vitro* dan pada manusia. Tanpa respon



Gambar 2. Imunologi COVID-19 dan tingkat keparahan penyakit (15).

tersebut, virus pada awalnya mereplikasi tanpa henti dan, respon imun adaptif tidak dipersiapkan sampai alarm imun bawaan terjadi (Gambar 2B). Pada kebanyakan kasus COVID-19 penundaan temporal dalam respons imun bawaan cukup untuk menghasilkan infeksi tanpa gejala (40% infeksi SARS-CoV-2 tidak bergejala) atau secara klinis penyakit ringan (“ringan” adalah definisi klinis COVID-19 yang berarti tidak memerlukan rawat inap) karena respons sel T dan antibodi terjadi relatif cepat dan mengendalikan infeksi (Gambar 2B) (17).

IFN yang tidak efektif pada sistem imun bawaan sangat terkait dengan kegagalan untuk mengendalikan infeksi SARS-CoV-2 primer dan risiko tinggi COVID-19 yang fatal, disertai dengan imunopatologi sel bawaan dan peningkatan sitokin plasma CXCL10, interleukin (IL) -6, dan IL-8. Respons IFN tipe I dan tipe III yang terganggu dan tertunda dikaitkan dengan risiko COVID-19 yang parah. Risiko respons imun bawaan awal yang buruk terhadap SARS-CoV-2, yaitu pada individu dengan respons IFN tipe I yang defek, merupakan temuan sebagai penyebab peningkatan risiko yang sangat tinggi terhadap COVID-19 yang parah atau fatal. Jika penundaan respons imun bawaan terlalu lama karena virus mampu menghindari dengan sangat efisien, imunitas bawaan yang rusak, atau kombinasi keduanya, maka virus (1) akan segera bereplikasi di saluran pernapasan bagian atas (URT) dan paru-paru, dan (2) gagal untuk memberikan respon imun adaptif untuk waktu yang lama, mengakibatkan kondisi yang menyebabkan penyakit paru-paru yang cukup parah, membutuhkan perawatan di rumah sakit (Gambar 2C). Faktor-faktor ini dapat diperkuat oleh faktor usia, karena individu lanjut usia memiliki kumpulan sel T naif yang lebih kecil dan oleh karena itu lebih sulit untuk membuat respons sel T dengan cepat yang dapat mengenali virus baru ini, yang juga mungkin menghasilkan respons netralisasi antibodi yang terhambat (17).

Sistem Imun Adaptif

Sistem kekebalan adaptif terdiri dari tiga jenis sel utama: sel B, Sel T CD4+, dan Sel T CD8+ (Gambar 1). Sel B menghasilkan antibodi. Sel T CD4+ memiliki berbagai fungsi pembantu dan efektor. Sel T CD8+ membunuh sel yang terinfeksi. Kekebalan adaptif melibatkan koordinasi respon imunitas sel T dan B terhadap virus SARS CoV-2. Dalam hal ini, kekebalan adaptif bertanggung jawab atas kekebalan yang bertahan lama dan mungkin mensterilkan virus. Respon imun terhadap virus SARS SARS CoV-2 terjadi dalam 7-10 hari pertama pasca infeksi. Sangat penting memahami durasi respon imunitas terhadap SARS Cov-2, terutama pada memori sel B dan/atau sel T baik yang ditimbulkan akibat infeksi alami maupun respon terhadap

vaksinasi. Hal ini akan memberikan informasi risiko infeksi dan penyakit yang berulang, yang akan sangat memengaruhi strategi penanganan pandemi secara keseluruhan (17).

Sel T CD4+

Respons sel T terdeteksi pada hampir semua setelah infeksi SARS-CoV-2. Respons sel T CD4+ terhadap SARS-CoV-2 lebih menonjol daripada respons Sel T CD8+ dan telah dikaitkan dengan pengendalian infeksi SARS-CoV-2 primer. Pada penelitian Chen *et al* dan Zhao *et al*. menunjukkan sel CD4+ lebih dominan berperan dalam pengendalian infeksi SARS-CoV pada model hewan coba dibandingkan dengan Sel T CD8+. Sel T yang spesifik terhadap protein virus apa pun dapat relevan untuk perlindungan kekebalan. Namun demikian, terdapat ketertarikan khusus pada respons sel T terhadap protein Spike SARS-CoV-2, karena hampir semua kandidat vaksin COVID-19 secara eksklusif mengandung antigen protein Spike. Selain itu, induksi antibodi anti-Spike bergantung pada Sel T CD4+ spesifik Spike, dengan kemungkinan kontribusi Sel T CD4+ spesifik untuk protein struktural virion lainnya. Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh Grifoni *et al*. meneliti respon CD4+ sel T terhadap semua protein SARS-CoV-2 pada kasus COVID-19 yang sembuh, respon terdeteksi terhadap hampir pada semua protein SARS-CoV-2 (21/24) dalam kelompok subjek, dengan respon Sel T CD4+ hanya tidak terdeteksi untuk protein terkecil. Dalam penelitian tersebut prevalensi dan besaran respon sel T CD4+ SARS-CoV-2 berkorelasi dengan tingkat ekspresi setiap protein SARS-CoV-2. Spike, M, dan nukleokapsid adalah target paling menonjol dari sel T CD4+ T spesifik SARS-CoV-2, dengan respons substansial juga terhadap ORF3a dan nsp3. Protein M sebagai target Sel T CD4+ sangat menarik, karena M adalah protein transmembran multipass yang relatif kecil yang buka merupakan protein berafinitas tinggi khusus sel T dalam repertoar naif yang menunjukkan bahwa M sangat sangat diekspresikan secara *in vivo*, atau dengan kata lain protein M sangat imunogenik. Meskipun protein Spike adalah antigen SARS-CoV-2 yang paling diakui secara konsisten, namun demikian dari sebuah “megapool” yang diprediksi sebagai epitop kelas II, dapat mengukur kurang lebih 50% dari respons Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 selain protein Spike. Pola antigen SARS-CoV-2 Sel T CD4+ yang dikenali tampaknya serupa selama fase infeksi akut, pemulihan dan memori konvalesen, meskipun respons sel CD4+ ORF7/8 CD4+ mungkin menunjukkan selektivitas relatif untuk fase akut dibanding pada fase setelahnya (18).

Studi sel T CD4 + SARS-CoV-2 lebih umum dari pasien yang sembuh daripada dari kasus akut. Penting untuk memahami kinetika respon sel T selama infeksi akut untuk dapat



menafsirkan kontribusi fungsional dari kekebalan adaptif untuk mengendalikan infeksi alami. Salah satu tantangan dalam literatur adalah bahwa pasien unit perawatan intensif (ICU) seringkali merupakan pasien akut yang paling dapat diakses untuk studi sel T, tetapi pengukuran sel T spesifik antigen pada pasien ICU adalah studi tentang penyakit stadium akhir, sekuelnya mungkin membuat hasil sulit untuk diinterpretasi. Situasi sebelumnya selama penyakit akut menjadi perhatian khusus, dimana Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 dapat dideteksi pada hari ke 2-4 setelah onset gejala. Terdetaksinya Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 lebih dini, berkorelasi dengan penurunan keparahan penyakit COVID-19, dibandingkan dengan antibodi dan sel CD8+ T. Induksi cepat Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 pada COVID-19 akut dikaitkan dengan penyakit ringan dan percepatan klirens virus. Sebaliknya, tidak adanya Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 yang lama setelah onset gejala dikaitkan dengan COVID-19 yang parah atau bahkan fatal (dalam beberapa kasus terdeteksi lebih dari hari ke-22 setelah gejala) (19).

Sel T CD4+ memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel Helper dan efektor, dengan kapasitas untuk menginstruksikan sel B, membantu sel T CD8+, merekrut sel imun bawaan, memiliki aktivitas antivirus langsung, dan memfasilitasi perbaikan jaringan. Sel T CD4+ spesifik virus biasanya berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel T follicular helper (Tfh). Sel Th1 memiliki aktivitas antivirus melalui produksi IFN γ dan sitokin terkait. Sel Tfh adalah penyedia khusus bantuan sel B dan sangat penting untuk pengembangan sebagian besar respons antibodi penetral, memori sel B dan imunitas humoral jangka panjang. Sel Tfh yang bersirkulasi (cTfh) spesifik SARS-CoV-2 dihasilkan selama infeksi SARS-CoV-2 akut, di mana frekuensi sel SARS-CoV-2 cTfh telah dikaitkan dengan penurunan keparahan penyakit. Sebagai catatan, fraksi substansial dari SARS-CoV-2 cTfh adalah CCR6+, yang berpotensi mengindikasikan *homing* mukosa saluran napas, yang juga telah diamati untuk virus korona flu biasa HKU1 (20).

CCR6 adalah reseptor kemokin yang terkait dengan migrasi ke jaringan mukosa. Ekspresi CCR6 oleh subset Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 mungkin mencerminkan atribut Th17 yang mendasari sel tersebut; namun, ekspresi protein IL-17 α dalam jumlah tidak terdeteksi atau rendah telah dilaporkan oleh Braun *et al.* 2020; Grifoni dkk., 2020; Juno dkk., 2020; Rydzynski Moderbacher dkk., 2020; Oja dkk., 2020; Sekine dkk., 2020; Weiskopf *et al.* 2020. Sebaliknya, IL-22, yang juga dapat dibuat oleh Sel T CD4+ mukosa, tampaknya diekspresikan dengan kuat oleh Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2. Sel CCR6+ IL-22+ dan CCR6+ IL-17+ dapat menjadi tipe sel yang sangat

independen pada infeksi lain. Khususnya, IL-22 sangat terkait dengan perbaikan jaringan, terutama sel epitel paru dan usus, menunjukkan bahwa respons Sel T CD4+ SARS-CoV-2 dapat secara aktif berpartisipasi dalam perbaikan jaringan paru-paru selama COVID-19. Memori SARS-CoV-2 Sel T CD4+ tampaknya mempertahankan kapasitas untuk membuat IL-22. Terdapat kekhawatiran besar tentang potensi penyimpangan kekebalan terhadap Th2 dan imunopatogenesis, tetapi Sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2 dari pasien secara konsisten tidak memiliki karakteristik Th2 (20).

Sel T CD8+

Sel CD8+ T sangat penting untuk pembersihan banyak infeksi virus, karena kemampuannya untuk membunuh sel yang terinfeksi. Pada infeksi SARS-CoV-2, keberadaan sel CD8+ T spesifik virus telah dikaitkan dengan hasil COVID-19 yang lebih baik. Secara keseluruhan, sel CD8+ T spesifik SARS-CoV-2 yang beredar kurang diamati secara konsisten dibandingkan sel CD4+ T. Peptida epitop kelas I HLA yang diprediksi dapat mengidentifikasi sebagian besar respons sel T CD8 spesifik SARS-CoV-2. Sel T SARS-CoV-2 CD8+ spesifik untuk berbagai antigen SARS-CoV-2, yaitu Spike, nukleokapsid, M, dan ORF3a. Seperti respon sel T CD4+ spesifik SARS-CoV-2, respon sel CD8+ T khusus SARS-CoV-2 dapat berkembang dengan cepat selama COVID-19 akut yaitu paling cepat dideteksi pada hari 1 setelah onset gejala. Pada COVID-19 akut, sel CD8+ T spesifik SARS-CoV-2 menunjukkan molekul tingkat tinggi yang terkait dengan fungsi efektor sitotoksik yang kuat, seperti IFN γ , granzim B, perforin, dan CD107a. Memori sel SARS-CoV-2 CD8+ T memiliki profil ekspresi yang serupa (20).

Imunitas Humoral

Besarnya dan kualitas respon humoral terhadap SARS-CoV-2 telah dikaitkan dengan hasil klinis. Meskipun respons humoral terhadap protein virus yang berbeda muncul dengan cepat dan terjadi pada sebagian besar individu yang terinfeksi, besarnya sangat bervariasi di antara mereka dan berkorelasi positif dengan tingkat keparahan penyakit COVID-19. Respon cepat ini ditandai dengan munculnya antibodi IgG, IgA dan IgM spesifik virus yang hampir bersamaan dengan *neutralizing antibody* terhadap epitop glikoprotein Spike. Antibodi terhadap domain Spike yang berinteraksi dengan reseptor seluler ACE2, yang dikenal sebagai RBD, terdapat pada sebagian besar individu yang terinfeksi dan memblokir masuknya virus dan infektivitas virus. Pada uji preklinik antibodi Netralisasi melindungi hewan coba bila diberikan sebelum terpapar virus, oleh karena itu, target utama pendekatan vaksin saat ini dan penggunaan klinisnya sebagai antibodi monoklonal rekombinan (mAbs) sedang dieksplorasi. Namun, hanya sedikit informasi yang tersedia

mengenai durasi respons humoral selama infeksi alami. Ini adalah masalah utama yang akan mempengaruhi pengelolaan pandemi dan menentukan kegunaan studi serokonversi dan tingkat *herd immunity*. Faktanya, telah dilaporkan beberapa kasus reinfeksi, menunjukkan bahwa kekebalan dapat bersifat sementara, seperti yang dilaporkan untuk virus corona lainnya.

Setelah infeksi awal COVID-19, respons imunitas humoral awal adalah terbentuknya IgM dan IgA, tetapi hal belum dapat dipastikan jelas apakah antibodi ini dapat mengubah perjalanan penyakit. Respons IgG selanjutnya terjadi dalam 7-10 hari pasca-infeksi dan diharapkan memberikan kekebalan sterilisasi terhadap virus, dan dengan perkembangan memori sel B menghasilkan respons IgG anti-COVID-19 berafinitas tinggi ketika terjadi eksposur kembali. Namun, diketahui bahwa intensitas, karakter, dan durasi respons IgG dapat sangat bervariasi. Titer IgG biasanya mencapai puncaknya sekitar 50-60 hari setelah infeksi dan dapat bertahan hingga 10 bulan atau mungkin lebih jika penelitian lebih lama lagi jangka waktunya.

Pengukuran antibodi terhadap epitop spesifik antigen SARS-CoV-2 memberi informasi penilaian sterilisasi yang lebih akurat dan imunitas yang signifikan secara klinis. Baru-baru ini, Barnes *et al.* melaporkan tentang bagaimana struktur dan spesifisitas antibodi penetral terhadap SARS-CoV-2 menginformasikan strategi terapeutik. Menggunakan analisis struktural, biofisik dan bioinformatika SARS-CoV-2, para peneliti menganalisis sudut pendekatan antibodi yang terikat pada RBD pada spike trimer. Oleh karena itu, penting untuk menganalisis sifat dan spesifisitas respons IgG terhadap COVID-19. Jika antibodi tidak diarahkan ke RBD dan tidak dapat mengikat trimer spike secara efektif, antibodi kemungkinan besar tidak efektif dalam mencegah infeksi. Ini juga harus benar untuk kombinasi antibodi monoklonal yang sekarang digunakan untuk terapi pada pasien dengan SARS-CoV-2. Yang menarik dalam hal ini adalah penggunaan plasma konvalesen, yang terbukti tidak bermanfaat dalam pengobatan pneumonia SARS-CoV-2 dalam uji coba terkontrol. Hal ini mungkin karena variasi dalam komposisi subkelas, titer, dan afinitas respons IgG pada pasien yang pulih dari SARS-CoV-2. Respon IgG awal berasal dari pusat germinal setelah sel folikel T mengaktifkan sel B naif menjadi matang, menjadi sel B yang teraktivasi kemudian berkembang menjadi sel memori B dan plasmablast penghasil IgG. *Plasmablast* berumur pendek, dan dengan disipasi respon IgG awal dihentikan. Namun, harus dipahami bahwa ini tidak berarti bahwa kekebalan telah berkurang. Ini karena persistensi sel memori B dan sel plasma berumur panjang yang berada di sumsum tulang dapat mengaktifkan

kembali respons spesifik antigen terhadap SARS-CoV-2 RBD jika terpapar kembali. Analisis respons humoral dan seluler terhadap vaksin akan menentukan ketahanan dan daya tahan proteksi. Selain itu, penilaian jangka panjang dari SARS-CoV-2 memori B dan T respon imun dimediasi sel pada pasien pulih dari infeksi atau mereka dengan memori imunologi reaktif silang akan membantu untuk menentukan risiko untuk masa depan terhadap infeksi SARS-CoV (21).

Sejumlah besar tes serologi, platform, dan metodologi sedang digunakan untuk menentukan seroprevalensi dalam populasi untuk memilih sampel plasma sembuh untuk uji terapeutik dan untuk memandu kebijakan tentang pembukaan kembali. Namun, tes tersebut memiliki variasi substansial dalam sensitivitas dan spesifisitas, dan kemampuannya untuk memprediksi tingkat NAb secara kuantitatif tidak diketahui. Sejumlah besar platform, dan metodologi pengujian tes serologi telah digunakan untuk menentukan seroprevalensi dalam populasi untuk memilih sampel plasma sembuh untuk uji terapeutik dan untuk memandu kebijakan tentang pembukaan kembali. Namun, tes tersebut memiliki variasi substansial dalam sensitivitas dan spesifisitas, dan kemampuannya untuk memprediksi tingkat NAb secara kuantitatif tidak diketahui. Pada Studi Luchsinger *et al.* menggunakan 370 donor unik yang terdaftar di New York Blood Center Convalescent Plasma Program antara April dan Mei 2020 untuk mengukur tingkat antibodi dalam sampel plasma konvalesen menggunakan tes untuk mendeteksi antibodi SARS-CoV-2 yang tersedia secara komersial dan mengukur kemampuan NAb menggunakan metode ELISA yang dikembangkan menggunakan partikel virus pseudotipe. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar sampel plasma konvalesen memiliki tingkat antibodi yang sedang dan memiliki tingkat akurasi yang beragam dalam memprediksi aktivitas NAb. Temuan ini memberikan relevansi klinis langsung dengan hasil serologi yang mempunyai korelasi dengan aktivitas NAb. Korelasi tersebut dapat berfungsi sebagai informasi awal yang berharga untuk memandu pilihan dan interpretasi tes serologis SARS-CoV-2 dalam menilai aktivitas sistem imun humoral pasien yang telah sembuh atau hasil vaksinasi (17,22).

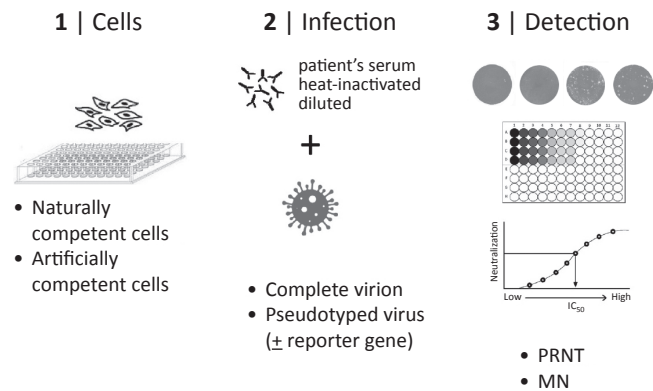
PEMERIKSAAN LABORATORIUM DALAM MENUNJANG KEBERHASILAN VAKSINASI

Pemeriksaan Netralisasi Antibodi

Virus neutralisation test (VNT) telah lama dianggap sebagai persenjataan virologi fundamental, dengan penerapan laboratorium hanya untuk *array* virus yang terbatas. Namun

demikian, VNT merupakan parameter yang mewakili potensi yang paling dapat diandalkan untuk imunoterapi pasif, seperti terapi antibodi monoklonal atau poliklonal, maupun pada pemberian vaksinasi. Tes untuk mengukur imunitas pelindung humoral terhadap SARS-CoV-2 tetap diperlukan untuk memahami respons imun pasien COVID-19, mengevaluasi keefektifan kandidat vaksin dalam uji klinis, dan melakukan studi epidemiologi skala besar. *Plaque-reduction neutralization test* (PRNT) adalah standar referensi untuk mengukur antibodi yang mampu menetralkan SARS-CoV-2. Namun, PRNT menuntut secara logistik, memakan waktu, dan membutuhkan fasilitas BSL level-3 untuk bekerja dengan aman dengan virus hidup. Sementara pengujian pengganti platform *throughput* tinggi memiliki waktu penyelesaian yang jauh lebih pendek dan korelasi yang baik dengan nAb sedang banyak dipelajari, metode netralisasi tetap menjadi baku emas untuk penghitungan nAb yang tepat. Pandemi Covid-19 memiliki manfaat tambahan untuk mempercepat penelitian tentang peningkatan pengujian nAb (23).

Salah satu ciri utama yang terkait dengan vaksin COVID-19 yang efektif adalah terbentuknya antibodi netralisasi yang diarahkan pada protein Spike. Ini adalah dasar untuk beberapa uji klinis dan juga dasar untuk pengembangan kombinasi antibodi monoklonal yang penting dalam terapi COVID-19 selain vaksin. Sifat antibodi yang ditujukan pada RBD SARS-CoV-2 menunjukkan bahwa antibodi yang mengikat RBD sangat penting untuk kekebalan perlindungan jangka panjang terhadap infeksi COVID-19 dan dikaitkan dengan kelangsungan hidup pasien yang lebih baik. Protein SARS-CoV-2 Spike (S) adalah protein permukaan utama SARS-CoV-2 sebagai target aktivitas netralisasi terdiri dari subunit S1 terminal-N yang bertanggung jawab atas pengikatan reseptor virus dan subunit terminal-C S2 bertanggung jawab atas fusi membran sel virus. S1 sendiri terdiri dari domain terminal-N dan domain pengikat reseptor (RBD). Kebanyakan coronavirus nAb menargetkan RBD, sementara beberapa wilayah target di subunit S2 atau situs pembelahan proteolitik S1/S2. Dengan menapisakan serum antibodi khusus subunit untuk menentukan kontribusi subunit individu ini terhadap respons nAb spesifik antigen, Steffen dkk. menunjukkan bahwa epitop dalam RBD adalah target mayoritas nAb, Barren dkk mengklasifikasikan nAbs ke dalam tiga kategori yaitu 1) VH3-53 hNAb dengan CDRH3 pendek yang memblokir enzim pengubah angiotensin 2 (ACE2) dan hanya mengikat RBD, 2) hNAb penghambat ACE2 yang mengikat RBD bagian atas dan bawah yang dapat menghubungkan RBD yang berdekatan, 3) hNAb yang mengikat di luar situs ACE2 dan mengenali RBD (24).



Gambar 3. Ringkasan komponen kunci dari uji netralisasi virus (24).

Daya tahan respons antibodi penetral (nAb) yang bersirkulasi terhadap infeksi SARS-CoV-2 dan peningkatannya dengan vaksinasi masih memerlukan penelitian tahap lanjut. Dalam sebuah studi yang dilakukan oleh Muena *et al.* menunjukkan bahwa individu seropositif SARS-CoV-2 rawat jalan dan rawat inap memiliki respons antibodi penetralisir (nAb) yang kuat yang masing-masing memuncak pada hari ke-23 dan 27 setelah onset gejala. Meskipun titer nAb tetap lebih tinggi pada pasien yang dirawat di rumah sakit, kedua kelompok studi menunjukkan respon nAb tahan lama yang dapat bertahan hingga 12 bulan setelah infeksi alami. Respon nAb ini pada individu yang sebelumnya seropositif dapat ditingkatkan secara signifikan melalui imunisasi dengan dua dosis vaksin CoronaVac (Sinovac) atau satu dosis vaksin BNT162b2 (BioNTech/Pfizer), menunjukkan induksi substansial dari respon memori sel B. Patut dicatat, tiga individu obesitas yang sebelumnya seropositif gagal meningkatkan respons penguat setelah vaksinasi, sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut pada populasi ini. Imunisasi individu yang naif dengan dua dosis vaksin CoronaVac atau satu dosis vaksin BNT162b2 menimbulkan tingkat nAbs yang serupa dibandingkan dengan individu seropositif 4,2 hingga 13,3 bulan pasca infeksi SARS-CoV-2. Dengan demikian, bukti awal ini menunjukkan bahwa individu yang seropositif dan naif, memerlukan dua dosis CoronaVac untuk memastikan induksi titer nAb yang kuat (24,25).

Plaque-Reduction Neutralization Test (PRNT)

Penghitungan akurat dari spesimen virus menular sangat penting untuk banyak aplikasi dalam virologi. Tes plak dibuat pada tahun 1952 sebagai adaptasi dari tes fag, yang digunakan untuk menghitung titer bakteriofag dalam biologi tanaman oleh Cooper pada tahun 1961; Dulbecco & Vogt, pada tahun 1953. Meskipun teknik baru untuk titrasi virus terus berkembang, uji plak tetap menjadi standar emas untuk penghitungan virus menular. PRNT adalah tes serologi yang memanfaatkan kemampuan antibodi spesifik

untuk menetralkan virus, mencegah virus menyebabkan pembentukan plak pada sebuah sel *monolayer*. PRNT dikenal juga sebagai test plak, sebuah metode kuantitatif untuk mengukur virus menular dengan mengukur plak yang terbentuk dalam kultur sel setelah infeksi dengan pengenceran serial dari spesimen virus. Titer virus infeksius diukur dalam unit pembentuk plak (PFU). Uji plak menjadi baku emas dalam mengukur konsentrasi virion litik yang berkompeten melakukan replikasi. Biasanya, pengujian ini melibatkan pencampuran jumlah virus yang konstan dengan pengenceran spesimen serum yang diuji, diikuti dengan pelapisan campuran tersebut ke *Cell Line* yang sesuai untuk masing-masing virus. Konsentrasi unit pembentuk plak dapat ditentukan dari jumlah plak yang terbentuk setelah beberapa hari. Pewarna penting (misalnya Merah netral) kemudian ditambahkan untuk visualisasi plak dan jumlah plak dalam pelat individu dibagi dengan jumlah viron asli untuk menghitung persentase netralisasi. Bergantung pada virusnya, unit pembentuk plak diukur dengan pengamatan mikroskopis, antibodi fluoresen, atau pewarna spesifik yang bereaksi dengan sel yang terinfeksi (24,26).

Saat ini terdapat 2 jenis pemeriksaan PRNT yang biasa digunakan pada kasus infeksi SARS-CoV-2, yaitu pemeriksaan dengan protokol klasik dan metode alternatif. Dalam kedua tes plak tersebut, dilakukan pada sel inang terinfeksi *monolayer* dengan pengenceran serial SARS-CoV-2 dengan konsentrasi awal yang tidak diketahui. Setelah proses adsorpsi sel inang, lapisan *immobilization* digunakan untuk menutupi *monolayer* yang terinfeksi, untuk mencegah penyebaran virus dan membatasi pertumbuhan virus ke loci sel di lokasi infeksi awal. Selama inkubasi, zona kematian sel berkembang karena infeksi virus dan replikasi terbatas pada lapisan *monolayer* dan sekitarnya, yang menyebabkan pembentukan plak. Setelah inkubasi, sel diwarnai untuk meningkatkan kontras antara plak dan *monolayer cell line* yang tidak terinfeksi. Plak kemudian dihitung dan digunakan untuk menghitung titer virus menular dalam spesimen. Metode pengujian plak dengan protokol klasik menggunakan agar Noble sebagai matrik *monolayer* dan menggunakan pewarna merah netral untuk meningkatkan visualisasi plak. Protokol pengujian plak ini dapat digunakan untuk penghitungan PFU SARS-CoV-2 dalam spesimen virus, termasuk stok virus yang dibuat dari supernatan kultur sel yang terinfeksi, dan dengan optimalisasi lebih lanjut, cairan tubuh dari hewan yang terinfeksi SARS-CoV-2. Sering kali, pengenceran 10 kali lipat dari spesimen yang mengandung jumlah SARS-CoV-2 yang tidak diketahui, teradsorpsi ke lapisan tunggal sel yang rentan. Setelah adsorpsi, *overlay medium* padat diaplikasikan ke lapisan tunggal sel untuk membatasi pertumbuhan virus ke

foci sel yang semula terinfeksi. Foci ini berkembang menjadi plak, yang divisualisasikan setelah penambahan *overlay medium* padat sekunder yang mengandung merah netral, yang digabungkan dan diikat oleh lisosom dalam sel yang kompeten. Hasilnya, plak bening dapat dibedakan dari lapisan tunggal berwarna merah kecoklatan yang tidak terinfeksi. Plak dihitung dan digunakan untuk menghitung titer virus dalam PFU/ml. Titer antibodi didefinisikan sebagai kebalikan dari pengenceran serum tertinggi yang menghasilkan >90% (PRNT90) atau >50% (PRNT50) pengurangan jumlah plak. Ketika PRNT dilakukan dalam pelat 96-lubang, ini disebut uji microneutralization (MN) (atau ketika, virus pseudotipe digunakan, uji pseudotipe MN [pMN]) (26).

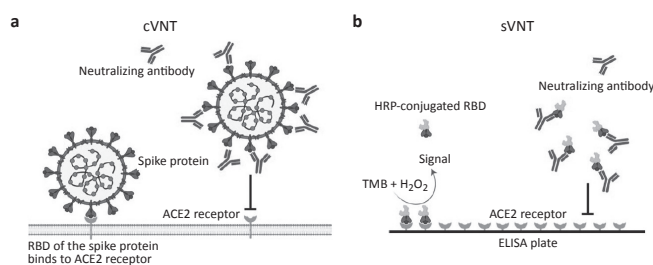
Metode uji plak kedua adalah Protokol Alternatif menggunakan karboksimetil selulosa (CMC) sebagai matriks dalam lapisan cair dan penambahan kristal violet sebagai pewarnaan untuk meningkatkan visualisasi plak. Berbeda dengan protokol dasar, metode ini menggunakan *liquid overlay matrix*, yang memberikan manfaat dibandingkan matriks *overlay* padat/semi-padat, termasuk kemudahan pelepasan sebelum fiksasi. Selain itu, lapisan cair dapat diterapkan ke lapisan tunggal sel pada suhu kamar, menghilangkan masalah pemadatan ulang selama proses aplikasi. Namun, kerugian dari *liquid overlay matrix* adalah gangguan pada *liquid overlay* dapat menyebabkan noda pada *monolayer*, dan dengan demikian harus sangat hati-hati untuk mencegah pergerakan plat selama masa inkubasi. Fiksasi dan pewarnaan selanjutnya dengan kristal violet yang digunakan untuk meningkatkan visualisasi plak dalam protokol memiliki beberapa keuntungan, termasuk peningkatan kontras antara plak dari warna *monolayer* ungu, serta inaktivasi virus. Selain itu, fiksasi memungkinkan pelat disimpan dan plak dihitung pada lain waktu. Namun, kelemahan dari metode ini adalah pembentukan limbah formaldehida dan kebutuhan tambahan untuk pengoalahan bahan kimia yang digunakan dengan benar (26).

Surrogate Virus Neutralization Test

Terdapat sebuah kebutuhan mendesak terhadap tes deteksi netralisasi antibodi COVID-19 untuk mengetahui kekebalan kawanan (*herd immunity*) dan kekebalan pelindung humoral di penyintas dan penerima vaksin. Standar umum untuk melakukan tes netralisasi antibodi saat ini adalah *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT), namun sistem pengujian ini membutuhkan laboratorium BSL3, membutuhkan banyak proses, harus dilakukan oleh tenaga yang sangat berkompeten, memiliki tingkat hasil yang rendah dan membutuhkan waktu dalam beberapa hari. Sistem *Surrogate Virus Neutralization Test* (sVNT) tidak

menggunakan virus yang direplikasi maupun yang dikultur dan menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), sehingga memungkinkan untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang banyak, proses otomatis dan waktu penyelesaian yang cepat. Beberapa tes ELISA yang tersedia secara internal pada sebuah laboratorium dan tersedia secara komersial telah dikembangkan untuk mendeteksi antibodi anti-SARS-CoV-2 yang muncul saat infeksi. Meskipun platform ini menyediakan sarana throughput tinggi untuk mendeteksi antibodi terhadap SARS-CoV-2, platform ini tidak dapat mengukur fungsi imunologis antibodi spesifik SARS-CoV-2. Sebaliknya, PRNT mengukur tingkat antibodi yang mampu menetralkan SARS-CoV-2. Namun, karena sifat PRNT yang memakan waktu dengan tingkat kerumitan yang tinggi, serta kebutuhan fasilitas BSL level 3 untuk bekerja dengan patogen kelompok risiko-3, kapasitasnya untuk diterapkan dalam pengujian imunitas skala besar juga terbatas (23,27).

sVNT mendeteksi NABs, tanpa memerlukan virus atau sel hidup, yang dapat diselesaikan dalam 1-2 jam di laboratorium BSL2. Menggunakan RBD murni dari protein S dan reseptor sel inang ACE2, pengujian dirancang untuk meniru interaksi virus-inang dalam pelat ELISA. Interaksi RBD-ACE2 ini dapat dinetralkan (diblokir) oleh NABs spesifik dalam serum pasien atau hewan, dengan cara yang sama seperti pada PRNT atau pVNT. Dalam study Tan *et al.* melaporkan sVNT SARS-CoV-2 mampu mendeteksi antibodi penetralisir imunodominan total yang menargetkan RBD protein S virus yang tidak bergantung pada isotipe dan spesies. Tes sederhana dan cepat ini didasarkan pada netralisasi yang dimediasi antibodi dari interaksi antara protein reseptor ACE2 dan RBD. Tes tersebut, telah divalidasi dengan dua kohort pasien COVID-19 di dua negara berbeda, dengan spesifisitas 99,93% dan sensitivitas 95-100%, serta dapat membedakan respons antibodi terhadap beberapa virus korona pada manusia (23).



Gambar 4. [a] Mekanisme cVNT (PRNT). Antibodi penetralisir SARS-CoV-2 memblokir protein lonjakan SARS-CoV-2 agar tidak mengikat protein reseptor hACE2 pada permukaan sel inang. [b] Dalam uji sVNT, antibodi netralisasi anti-SARS-CoV-2 memblokir protein RBD terkonjugasi HRP agar tidak mengikat protein hACE2 yang telah dilapisi sebelumnya pada pelat ELISA (23).

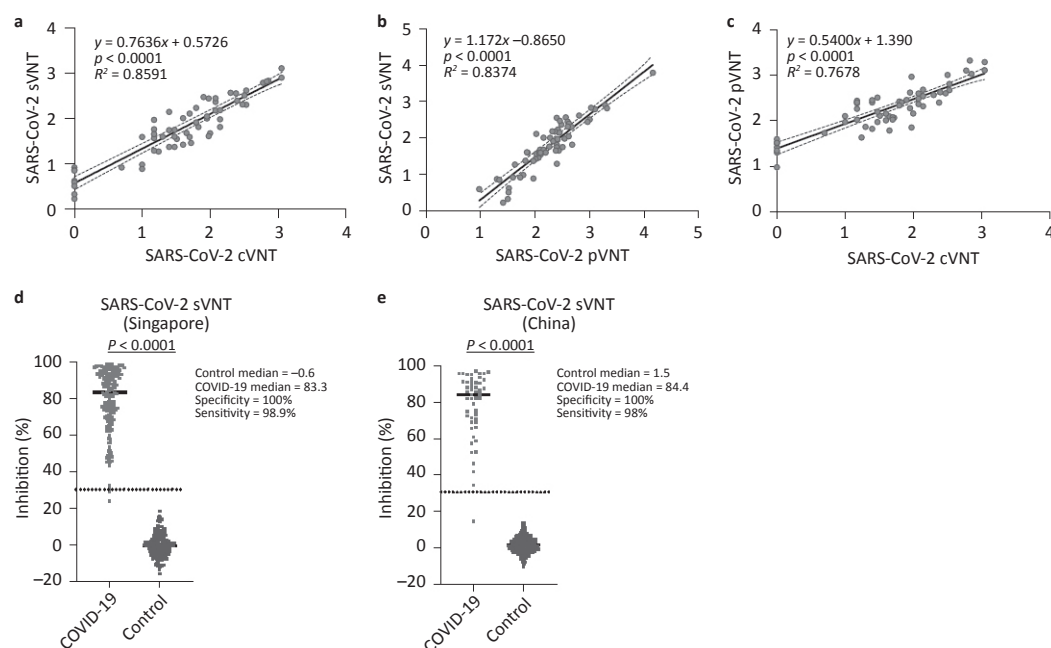
Pada study yang dilakukan oleh Valcourt *et al.* mengevaluasi sensitivitas, spesifisitas, dan reaktivitas silang sVNT dibandingkan dengan PRNT menggunakan netralisasi 50% dan 90% SARS-CoV-2 sebagai standar referensi. Pada study ini menunjukkan Terdapat korelasi antara sVNT (Genscript Pass) dengan PRNT-50 ($r=0,73$) serta dengan PRNT-90 ($r=0,65$), akan tetapi sVNT genscript pass juga mendeteksi antibod non-netralisasi serta terdapat *cross reactivity* terhadap SARS-CoV1 dan sifilis. Oleh karena itu algoritma pemanfaatan sVNT yang diajukan dalam penelitian tersebut adalah sebagai alat skrining sebelum pengujian PRNT konfirmatori untuk evaluasi antibodi penetralisir SARS-CoV-2. Algoritma ini digunakan untuk lebih memahami respons imun pasien COVID-19, mengevaluasi kemandirian kandidat vaksin dalam uji klinis, dan melakukan studi epidemiologi skala besar (26).

Pengujian sVNT mungkin tidak akan pernah dapat sepenuhnya menggantikan cVNT, data tersebut menunjukkan bahwa performa sVNT berkorelasi baik dengan performa cVNT dan pVNT. Penerapannya dapat mencakup banyak aspek investigasi COVID-19 mulai dari pelacakan kontak, survei seroprevalensi dan *reservoir*/pelacakan hewan perantara hingga penilaian *herd immunity* dan durasi imunitas protektif. Tes ini juga dapat dimanfaatkan untuk menilai efikasi vaksin selama uji praklinis dan klinis dari kandidat vaksin yang berbeda dan untuk memantau titer penetral dalam vaksin setelah vaksinasi massal pada populasi (23).

Tes Antibodi SARS-CoV-2 Kuantitatif untuk menentukan status antibodi pasca-vaksinasi

Tes antibodi SARS-CoV-2 masih memainkan peran penting dalam pengelolaan pandemi COVID-19. Deteksi antibodi spesifik setelah infeksi SARS-CoV-2 penting pada tingkat individu dan populasi untuk mengidentifikasi mereka yang berisiko terinfeksi. Namun, sekarang di era vaksinasi COVID-19, peran penting lain dari serologi SARS-CoV-2 semakin meningkat yaitu: penentuan antibodi spesifik setelah imunisasi aktif. Meskipun peran baru ini belum secara final ditentukan, sudah jelas bahwa uji antibodi akan dibutuhkan baik untuk pengembangan vaksin dan proses persetujuan dan tindak lanjut dari individu yang divaksinasi. Untuk alasan ini, korelasi perlindungan yang diinduksi oleh vaksin harus menggantikan, setidaknya sebagian, pengukuran hasil klinis sebagai satu-satunya ukuran. Untuk alasan kesederhanaan, standarisasi yang relatif baik, dan penerapan yang luas, tes antibodi SARS-CoV-2 memiliki peluang terbaik untuk menjadi titik akhir pengganti pengukuran hasil klinis tersebut (27).

Sistem pengujian antibodi SARS-CoV-2 pertama dirancang untuk membedakan individu dengan infeksi COVID-19



Gambar 5. Sensitifitas, spesifisitas, dan *robustness* sVNT, a - c, Analisis korelasi pada 60 serum convalesen COVID-19 dengan berbagai level SARS-CoV-2 NAb oleh sVNT dan cVNT (a), sVNT dan pVNT (b), serta pVNT dan cVNT (c). Analisis korelasi dan regresi linier dilakukan di GraphPad Prism menggunakan koefisien korelasi Pearson. Signifikansi statistik dihitung dengan menggunakan *two-tailed test*. Data yang disajikan adalah log titer netralisasi untuk cVNT dan log nilai IC50 untuk sVNT atau pVNT dan merupakan mean dari dua percobaan independen. Garis putus-putus menunjukkan deviasi standar dari plot regresi linier. d, e, Pengujian kelompok kontrol sehat dan COVID-19 serum di Singapura (d) (COVID-19 $n = 175$, kontrol $n = 200$) dan Nanjing, Cina (COVID-19 $n = 50$, kontrol $n = 200$) (e) pada pengenceran serum akhir 1:20. Garis horizontal menunjukkan nilai median. Garis putus-putus mewakili batas penghambatan 30%. Nilai P yang disajikan dalam d dan e dihitung dengan *unpaired two-tailed Student's t-tests* (23).

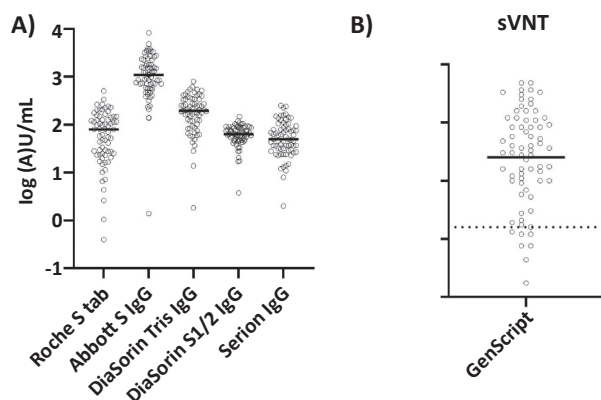
sebelumnya dari mereka yang masih naif terhadap virus baru ini. Oleh karena itu, immunoassay ini biasanya dikembangkan sebagai tes kualitatif daripada kuantitatif dan dirancang oleh pabrikan untuk mencapai spesifisitas tertinggi dan sensitivitas tinggi. Spesifisitas tinggi sangat diperlukan, terutama pada awal pandemi, karena tingkat seroprevalensi yang sangat rendah menyebabkan banyak positif palsu dan nilai prediksi positif rendah bahkan dengan tes yang memiliki spesifisitas 99% terhadap PCR. Konsekuensi pemelihan spesifitas tinggi, jika tidak diimbangi dengan sensitivitas yang tinggi dapat menyebabkan false negatif pada kasus titer antibodi yang rendah yaitu pada kondisi infeksi ringan atau asimtomatik, dan pada kondisi penurunan titer antibodi secara alami seiring waktu paska infeksi (28).

Berbagai antigen telah digunakan untuk tujuan ini, tetapi pada dasarnya dua jenis dapat dibedakan: tes berbasis protein N dan S. Antibodi yang ditujukan terhadap antigen N spesifik SARS-CoV-2 diinduksi lebih awal dan kuat pada sebagian besar individu yang terinfeksi karena antigen ini memiliki imunogenisitas kuat dan spesifik. Spesifisitas yang sangat tinggi dapat dicapai dengan modifikasi target

antigen N sehingga tidak ada reaktivitas silang yang diamati bahkan dengan virus yang berkerabat dekat. Oleh karena itu, sifat diskriminatif dari tes antibodi berbasis nukleokapsid dapat menjadi sangat baik. Signifikansi fisiologis antibodi ini, di sisi lain, tidak begitu jelas, dan penanda pengganti ini untuk infeksi sebelumnya tidak mungkin relevan secara fungsional untuk memberikan perlindungan atau kekebalan. Antibodi yang bereaksi dengan protein S cenderung memiliki fungsi antibodi netralisasi yang ditunjukkan melalui berbagai penelitian korelasi antara uji pengikatan protein S dan berbagai bentuk uji netralisasi virus fungsional (21-26).

Dalam konteks vaksin SARS-CoV-2, justru antibodi netralisasi inilah yang sangat penting. Tujuan utama dari imunisasi aktif adalah untuk menginduksi banyak antibodi penetralisir spesifik SARS-CoV-2 yang secara ideal mencegah masuknya patogen dan dengan demikian infeksi atau menghentikan penyebaran sistemik untuk mencegah penyakit. Meskipun perlindungan yang berkaitan dengan kekebalan pada SARS-CoV-2 belum ditentukan, tes antibodi terhadap protein S akan berguna sebagai *baseline* surveillance data yang dapat disimpulkan kemudian. Oleh karena itu, Prekmann *et al.* dalam penelitiannya, membandingkan

uji antibodi SARS-CoV-2 komersial yang berbeda dengan reaktivitas protein S menggunakan kohort vaksinasi untuk memberikan wawasan pertama tentang perbandingan uji ini. Studi pengamatan prospektif ini melibatkan serum yang diambil dari 69 orang tanpa infeksi SARS-CoV-2 sebelumnya yang diambil 21 ± 1 hari (rata-rata $\pm$ standar deviasi) setelah dosis pertama vaksin Pfizer/BioNTech BNT162b2 diuji menggunakan uji antibodi SARS-CoV-2 kuantitatif berikut: Antibodi total Roche S, DiaSorin trimeric spike IgG, DiaSorin S1/S2 IgG, Abbott II IgG, dan Serion/Virion IgG. Kesepakatan tes dinilai dengan regresi *Passing-Bablok*. Hasil selanjutnya dibandingkan dengan persen penghambatan yang dihitung dari sVNT dengan korelasi dan analisis ROC. Pengujian yang dilakukan menunjukkan kesesuaian secara keseluruhan yang baik ($p = 0,80-0,94$), regresi *Passing-Bablok* mengungkapkan perbedaan sistematis dan proporsional, yang tidak dapat dihilangkan dengan mengubah hasil menjadi BAU/mL seperti yang disarankan oleh produsen. Tujuh (10%) individu memiliki hasil sVNT negatif (yaitu $<30\%$ penghambatan). Sampel-sampel ini diidentifikasi dengan baik oleh sebagian besar tes dan menghasilkan tingkat antibodi pengikat yang rendah (ROC-AUCs 0.84-0.93) dibandingkan dengan sVNT. Meskipun semua tes yang dievaluasi menunjukkan korelasi yang baik, pembacaan dari tes yang berbeda tidak dapat dipertukarkan, bahkan ketika diubah menjadi BAU/mL menggunakan standar internasional WHO untuk imunoglobulin SARS-CoV-2. Hal ini menunjukkan perlunya standarisasi lebih lanjut untuk serologi SARS-CoV-2 (27).



Gambar 6. Hasil dari *binding assay* (A) dan uji netralisasi virus pengganti, sVNT (B). Garis takterputus menandai median. Garis putus-putus di (B) menandai *cutoff* pabrikan untuk kepositifan (30%) (27).

Studi yang dilakukan Suhandynata *et al.* dilakukan dengan Sebuah uji netralisasi divalidasi dalam satu set spesimen positif terkonfirmasi PCR dan dalam kohort negatif. Selain itu, 9530 spesimen disaring menggunakan uji serologi IgG Diazyme SARS-CoV-2 dan semua hasil positif ($N=164$

individu) dianalisis ulang menggunakan uji netralisasi, uji imunoglobulin total Roche, dan uji Abbott IgG. Hubungan antara besarnya hasil serologi SARS-CoV-2 positif dan aktivitas penetralan ditentukan. Titer antibodi penetral (pengenceran penghambatan 50%, ID50) juga dipantau secara longitudinal pada pasien yang dipastikan menderita SARS-CoV-2 dengan PCR. Uji netralisasi SARS-CoV-2 memiliki *positive percentage agreement* (PPA) 96,6% dengan tes SARS-CoV-2 PCR dan *Negative percentage agreement* (NPA) 98,0% pada 100 individu kontrol negatif. Titer netralisasi ID50 berkorelasi positif dengan ketiga platform serologi dan klinis. Pemantauan longitudinal pasien yang dikonfirmasi PCR yang dirawat di rumah sakit dengan COVID-19 menunjukkan bahwa mereka menghasilkan titer netralisasi tinggi terhadap SARS-CoV-2. PPA antara uji Diazyme IgG saja dan uji netralisasi adalah 50,6%, sedangkan kombinasi uji Diazyme IgG dengan platform Roche atau Abbott meningkatkan PPA masing-masing menjadi 79,2 dan 78,4% (28).

Berikut adalah pemeriksaan kuantitatif antibodi SARS-CoV-2 yang tersedia secara komersial:

- Roche Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S (Roche S tAb) dengan metode *electrochemiluminescence sandwich immunoassay* (ECLIA) dan mendeteksi antibodi total terhadap *receptor-binding domain* (RBD) dari protein spike dan diukur dengan penganalisis modular cobas® e801, e411, dan e601 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Swiss). Rentang penghitungan antara 0,4 dan 2500,0 U/mL. Pabrikan menyatakan presisi intra dan interassay antara 1 dan 3%, spesifisitas klinis 99,98% (99,91-100), dan sensitivitas kumulatif ≥ 14 hari setelah PCR positif pertama 98,8% (98,1 - 99,3) jika 0,8 U/mL digunakan sebagai *cut-off* (26). Kriteria titer antibodi kategori tinggi untuk terapi plasma konvalesen sesuai dengan rekomendasi FDA adalah ≥ 132 U/mL (27,29,30).
- Abbott SARS-CoV-2 IgG II (Abbott S IgG) dengan metode *chemiluminescence microparticle immunoassay* (CMIA). Tes ini mengukur antibodi tipe IgG terhadap RBD protein S virus pada platform Abbott ARCHITECT (Abbott, Abbott Park, USA) dengan rentang 21,0-40,000 AU/mL. Presisi intra dan interassay berkisar antara 3 dan 5%. Menurut pabrikan, spesifisitas klinis adalah 99,55% (99,15-99,76), dan sensitivitas klinis adalah 98,81% (93,56-99,94) ≥ 15 hari setelah PCR positif pertama dengan batas ≥ 50 AU/mL (26). Kriteria titer antibodi kategori tinggi untuk terapi plasma konvalesen sesuai dengan rekomendasi FDA adalah ≥ 840 AU/mL (27,29,30).

Selain dari dua merk reagen tersebut terdapat 10 reagen lainnya yang merupakan adaptif respon terhadap

protein S SARS-CoV-2 yang telah mendapatkan *Emergency Use Authorizations* (EUA) dari FDA. Dalam pemanfaatannya untuk menilai efektifitas dari vaksinasi saat ini belum tersedia nilai cut off titer antibody yang dapat digunakan sebagai rujukan nilai titer antibody yang memberikan proteksi terhadap infeksi SARS-CoV-2. Namun demikian FDA telah memberikan kategori untuk titer antibody tinggi yang dapat dimanfaatkan dalam terapi plasma konvalesen. Hal ini dapat dijadikan panduan sementara untuk mengkategorikan respon sistem imun yang tergolong tinggi yang diharapkan dapat memberikan proteksi terhadap infeksi maupun keparahan penyakit akibat COVID-19 (29,30).

Menginterpretasi hasil serologi, bagaimanapun merupakan suatu proses yang kompleks, hal ini terutama dikarenakan terdapat beberapa jenis dan sub tipe antibody dan beberapa determinan/epitop antigenik yang digunakan untuk menargetkan antibody Protein S-RBD, sehingga hasilnya mungkin berbeda secara substansial tergantung pada strategi pengembangan reagen yang dipilih. Hasil pemeriksaan juga akan tergantung pada spesifikasi manufaktur dari pengujian yang digunakan seperti epitop yang digunakan, detektor dan kuantifikasi yang digunakan, dan lain sebagainya. Beberapa produsen menyediakan faktor konversi terhadap standar Internasional WHO untuk imunoglobulin SARS-CoV-2, standarisasi ini tidak dilakukan pada saat pengembangan sistem pengujian, tetapi *post-hoc* sebagai bahan referensi untuk menentukan faktor konversi unit dalam BAU/mL masing-masing produsen. Namun demikian masing-masing reagen pemeriksaan, hasil-nya tidak dapat dipertukarkan walaupun memiliki korelasi yang baik terhadap BAU/mL. Oleh karena itu jika dibutuhkan pemeriksaan serial dalam memantau durasi respon antibody harus menggunakan platform dan reagen yang sama termasuk laboratorium yang sama agar dapat membandingkan dengan pemeriksaan sebelumnya (27).

PENUTUP

Vaksinasi merupakan salah satu cara untuk memerangi pandemi, demikian juga dengan vaksin COVID-19 diharapkan dapat menurunkan penyebaran dan dampak penyakitnya. Dalam kondisi pandemi, vaksin dipersyaratkan mempunyai efikasi >50% untuk dapat diberikan izin penggunaan dalam kondisi darurat. Beberapa vaksin pada uji klinik fase 3 menunjukkan efikasi yang mendekati angka 100%. Pasca vaksinasi COVID-19 dapat diukur antibody terhadap protein S RBD yang diketahui mempunyai daya netralisasi, karena pemeriksaan PRNT sebagai baku emas memerlukan

persyaratan BSL level 3 dan lebih berisiko tinggi. Selain itu terdapat pemeriksaan pengganti untuk mengetahui antibody netralisasi terhadap SARS-CoV-2, yaitu sNVT yang merupakan pemeriksaan serologi antibody terhadap protein S-RBD SARS-CoV-2 dan terbukti berkorelasi dengan pemeriksaan baku emas PRNT. Meskipun saat ini belum tersedia cut-off titer antibody protektif terhadap SARS-CoV-2, namun informasi terbentuknya antibody memberikan indikator sementara keberhasilan vaksinasi yang lebih mudah diamati.

DAFTAR PUSTAKA

1. Doherty M, Buchy P, Standaert B, Giaquinto C, Prado-Cohrs D. Vaccine impact: Benefits for human health. *Vaccine*. 2016;34(52):6707-6714.
2. Kwon Y, Forthal D. COVID-19: An unprecedented challenge and an opportunity for change. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;171:48-49.
3. Who.int. 2021 [cited 3 Mei 2021]. Available from: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2020_MAY_tableH5N1.pdf?ua=1
4. Chan P. Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(Supplement_2):S58-S64.
5. Jain S, Batra H, Yadav P, Chand S. COVID-19 Vaccines Currently under Preclinical and Clinical Studies, and Associated Antiviral Immune Response. *Vaccines*. 2020;8(4):649.
6. Ura T, Yamashita A, Mizuki N, Okuda K, Shimada M. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine*. 2021;39(2):197-201.
7. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines [Internet]. Who.int. 2021 [cited 1 June 2021]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
8. van Riel D, de Wit E. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature Materials*. 2020;19(8):810-812.
9. Human Coronavirus Types | CDC [Internet]. Cdc.gov. 2021 [cited 3 May 2021]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>
10. Ou X, Liu Y, Lei X Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;1620:11. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
11. Park Su Eun. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19) *Clin Exp Pediatr*. 2020:119-124. doi: 10.3345/cep.2020.00493
12. Jain S, Batra H, Yadav P, Chand S. COVID-19 Vaccines Currently under Preclinical and Clinical Studies, and



- Associated Antiviral Immune Response. *Vaccines*. 2020;8(4):649.
13. Vaxart Announces FDA Clearance of IND Application for Oral COVID-19 Vaccine and Provides Update on COVID-19 Program | Vaxart, Inc. [Internet]. Vaxart, Inc. 2021 [cited 1 June 2021]. Available from: <https://investors.vaxart.com/news-releases/news-release-details/vaxart-announces-fda-clearance-ind-application-oral-covid-19>
 14. Wang, F.; Kream, R.M.; Stefano, G.B. An Evidence Based Perspective on mRNA-SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Med. Sci. Monit.* 2020, 26, e924700-e924701.
 15. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861-880.
 16. Arunachalam P, Wimmers F, Mok C, Perera R, Scott M, Hagan T et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science*. 2020;369(6508):1210-1220.
 17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, Rawlings SA, Sutherland A, Premkumar L, Jadi RS Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181:1489-1501.e15.
 18. Tan AT, Linster M, Tan CW, Bert NL, Chia WN, Kunasegaran K, Zhuang Y, Tham CYL, Chia A, Smith GJ Early induction of SARS-CoV-2 specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *bioRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.10.15.341958.
 19. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI-C, Tiu C, Hu Z, Chen VC-W, Young BE, Sia WR A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020;38:1073-1078.
 20. Juno JA, Tan H-X, Lee WS, Reynaldi A, Kelly HG, Wragg K, Esterbauer R, Kent HE, Batten CJ, Mordant FL Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020;26:1428-1434.
 21. Barnes C, Jette C, Abernathy M, Dam K, Esswein S, Gristick H et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*. 2020;588(7839):682-687.
 22. Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois M. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
 23. Tan, CW, Chia, WN, Qin, X A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol* 38, 1073-1078 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
 24. Focosi D, Maggi F, Mazzetti P, Pistello M. Viral infection neutralization tests: A focus on severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 with implications for convalescent plasma therapy. *Reviews in Medical Virology*. 2020;31(2).
 25. Muenz N, García-Salum T, Pardo-Roa C, Serrano E, Levican J, Avendaño M et al. Long-lasting neutralizing antibody responses in SARS-CoV-2 seropositive individuals are robustly boosted by immunization with the CoronaVac and BNT162b2 vaccines. 2021.
 26. Mendoza E, Mangiat K, Wood H, Drebot M. Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. *Current Protocols in Microbiology*. 2020;57(1).
 27. Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Koller T, Mucher P, Radakovics A, Marculescu R et al. Anti-Spike protein assays to determine post-vaccination antibody levels: a head-to-head comparison of five quantitative assays. 2021.
 28. Suhandynata R, Bevins N, Tran J, Huang D, Hoffman M, Lund K et al. SARS-CoV-2 Serology Status Detected by Commercialized Platforms Distinguishes Previous Infection and Vaccination Adaptive Immune Responses. 2021.
 29. World Health Organization. (2021). COVID-19 natural immunity: scientific brief, 10 May 2021. WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341241>.
 30. Bowman, B., 2021. FDA In Brief: *FDA Updates Emergency Use Authorization for COVID-19 Convalescent Plasma to Reflect New Data*. [online] [Fda.gov](https://www.fda.gov/media/141477/download). Available at: <https://www.fda.gov/media/141477/download>

FORUM DIAGNOSTICUM

ISSN 0854-7173 | No. 4/2021

Redaksi Kehormatan

Drs. Andi Wijaya, Ph.D.
Prof. Dr. dr. FX Budhianto Suhadi

Ketua Dewan Redaksi/Penanggung Jawab

Dr. Trilis Yulianti, M.Kes.

Alamat Redaksi

PT. Prodia Widyahusada
Jl. Kramat Raya 150, Jakarta 10430
Telepon: (021) 3144182 (Hunting)
Fax: (021) 3926675
e-mail: produk@prodia.co.id
website: www.prodia.co.id

Anggota Dewan Redaksi

Elva Aprilia Nasution, S.Farm.
Rina Triana, M.Farm., Apt.
Siska Darmayanti, S.Si., M.Farm.
Gianni Yosephine, S.Si., M.Farm.
Ardian Susanto, M.Farm.
Matthew Justyn, S.Si.



Certificate Number : JST 0480047
Certified to GMS

Juli 2021 - PR0004031