

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania
w Języku Angielskim



Lekarz Justyna Adamczuk

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Ocena obecności przeciwciał anty-SARS-CoV-2 u rekonwalescentów
po COVID-19

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Anna Moniuszko-Malinowska
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

*Praca doktorska została przygotowana w oparciu o wyniki będące elementem badań finansowanych z grantu Narodowego Centrum Nauki. „Koniec początku czy początek końca? Krótko i długoterminowe trajektorie zdrowotnych i psychospołecznych efektów pandemii COVID-19.” w ramach konkursu OPUS 19 (UMO-2020/37/B/NZ7/03380).
Kierownik grantu: prof. dr hab. Karol Kamiński*

Białystok, 2024

Spis treści

| | |
|--|----|
| Wykaz stosowanych skrótów: | 4 |
| 1. COVID-19 | 5 |
| 1.1 Rys historyczny | 5 |
| 1.2 Epidemiologia | 7 |
| 1.3 Etiologia | 9 |
| 1.4 Patogeneza..... | 9 |
| 1.5 Obraz kliniczny | 11 |
| 1.5.1 Stadium I | 12 |
| 1.5.2 Stadium II..... | 13 |
| 1.5.3 Stadium III..... | 13 |
| 1.5.4 Stadium IV | 13 |
| 1.6 Diagnostyka..... | 14 |
| 1.6.1 Metoda PCR | 14 |
| 1.6.2 Testy antygenowe..... | 15 |
| 1.6.3 Metody serologiczne | 16 |
| 1.6.4 Badania radiologiczne | 20 |
| 1.6.5 Tomografia komputerowa | 21 |
| 1.7 Leczenie | 24 |
| 1.7.1 Leczenie w I stadium choroby | 24 |
| 1.7.2 Leczenie w II stadium choroby | 26 |
| 1.7.3 Leczenie w III stadium choroby..... | 27 |
| 1.7.4 Leczenie w IV stadium choroby..... | 27 |
| 1.8 Powikłania, „zespół post-COVID-19” i „Long- COVID” | 28 |
| 1.8.1 Układ oddechowy..... | 28 |
| 1.8.2 Układ nerwowy | 29 |
| 1.8.3 Układ krążenia..... | 29 |
| 1.9 Profilaktyka | 30 |
| 1.9.3 Przystosowanie szczepionek do poszczególnych wariantów wirusa (2022-2023): | 30 |

| | |
|---|----|
| 1.9.4 Rozszerzanie Zakresu Szczepień (2023-obecnie): | 30 |
| 1.9.5 Badania naukowe i nowe technologie w zakresie szczepień: | 30 |
| 2. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniu SARS-CoV-2..... | 31 |
| 2.1 Przydatność szybkich testów immunochromatograficznych | 35 |
| 2.2 Rola przeciwciał neutralizujących | 35 |
| 2.3 Badanie odporności poszczepiennej..... | 39 |
| 2.4 Ocena odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z immunosupresją | 40 |
| 3. Cele pracy:..... | 43 |
| 3.1 Etap I | 43 |
| 3.2 Etap II..... | 44 |
| 4. Materiał i metody: | 44 |
| 4.1 Etap I | 44 |
| 4.2 Etap II..... | 45 |
| 5. Analiza statystyczna | 48 |
| 6. Wyniki:..... | 48 |
| 6.1 Ogólne wyniki etapu I..... | 48 |
| 6.1.1 Etap I | 50 |
| 6.1.2 Porównanie wyników badań serologicznych w zależności od wywiadu szczepień | 53 |
| 6.2 Etap II..... | 56 |
| 6.2.1 Porównanie miana przeciwciał anti-N pomiędzy falami..... | 61 |
| 6.2.2 Porównanie miana przeciwciał anti-S między falami | 62 |
| 6.2.3 Miana przeciwciał anti-N i anti-S u pacjentów zaszczepionych w porównaniu do nieszczepionych | 62 |
| 7. Dyskusja | 63 |
| 8. Wnioski | 73 |
| 9. Streszczenie | 74 |
| 10. Summary | 76 |
| 11. Spis tabel | 78 |
| 12. Spis rycin..... | 80 |
| 13. Piśmiennictwo | 81 |

Wykaz stosowanych skrótów:

ACE2 (ang. angiotensin converting enzyme 2) – konwertaza angiotensyny 2,

ARDS (ang. acute respiratory distress syndrome) – zespół ostrej niewydolności oddechowej,

COVID-19 (ang. coronavirus disease) – choroba spowodowana przez SARS-CoV-2,

eGFR (ang. estimated glomerular filtration rate) – oszacowane przesączanie kłębuszkowe,

FDA (ang. Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków,

GKS – glikokortykosteroidy,

GISAID – (ang. Global Initiative on Sharing All Influenza Data) – otwarty dostęp do danych genetycznych wirusów grypy,

HDCz – heparyna drobnocząsteczkowa,

IFN – interferon,

Il – interleukina,

LFA – (ang. lateral flow assay) – test przepływu bocznego,

MERS (Middle East respiratory syndrome) – bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej,

PaO₂ – ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla we krwi tętniczej,

RDT – (ang. rapid diagnostic test) szybki test diagnostyczny,

RT-PCR – (ang. reverse-transcription polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją,

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) – koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2,

SpO₂ – wysycenie tlenem hemoglobiny krwi tętniczej mierzone za pomocą pulsoksymetru,

TNF- α – (ang. tumor necrosis factor α) – cytokina, czynnik martwicy nowotworów,

WHO (World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia.

1. COVID-19

COVID-19, czyli choroba wywołana przez koronawirusa SARS-CoV-2, została po raz pierwszy zidentyfikowana w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan, w prowincji Hubei, w Chinach. Nazwa "COVID-19" jest skrótem od "coronavirus disease 2019". Choroba ta szybko rozprzestrzeniła się na cały świat, stając się pandemią. W marcu 2020 roku, gdy liczba zakażonych i zgonów zaczęła gwałtownie rosnać na całym globie, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), ogłosiła pandemię COVID-19.

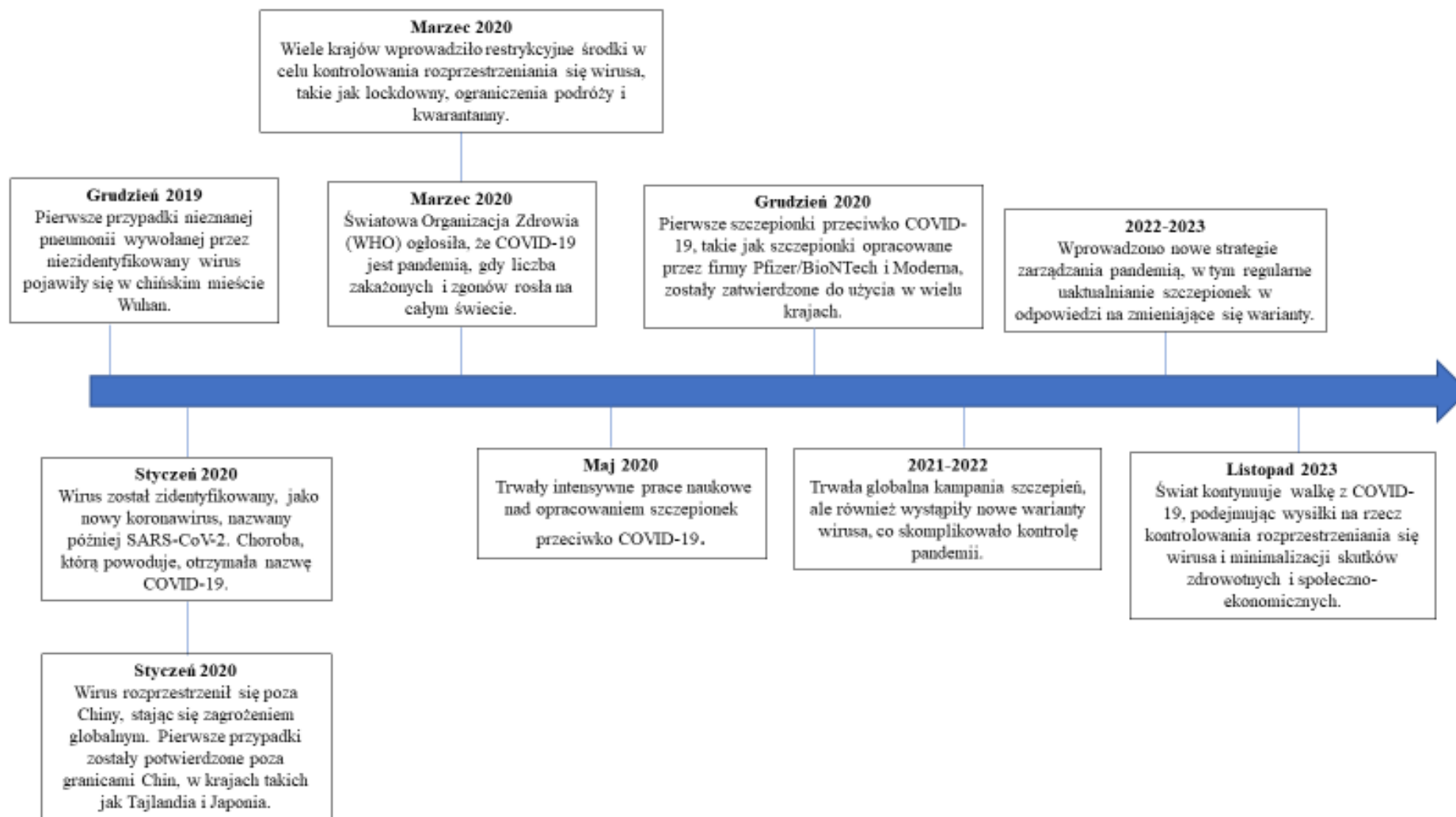
Choroba COVID-19 przenosi się drogą kropelkową, poprzez wdychanie zakaźnych cząstek wirusa lub kontakt tych cząstek, z nosem lub ustami. Największe ryzyko występuje po bliskim kontakcie z osobą zakażoną wirusem SARS-CoV-2, ale małe cząstki wydzieliny zakażonego pacjenta, zawierające wirusa mogą unosić się w powietrzu i przenosić się na większe odległości, szczególnie wewnątrz zamkniętych pomieszczeń, np. sala chorych. Zakażenie może również nastąpić po kontakcie z powierzchniami lub przedmiotami zanieczyszczonymi wirusem [1].

Obraz kliniczny COVID-19 charakteryzuje się różnorodnym spektrum objawów, począwszy od łagodnych do ciężkich, które mogą obejmować gorączkę, kaszel, duszność, zmęczenie, bóle mięśni, utratę smaku i węchu, a także inne objawy związane z układem oddechowym. U niektórych pacjentów choroba może przebiegać bezobjawowo lub z objawami o łagodnym nasileniu, podczas gdy u innych może prowadzić do poważnych powikłań, w tym niewydolności oddechowej, zapalenia płuc, niewydolności wielonarządowej i zgonu [2].

1.1 Rys historyczny

Rys historyczny COVID-19 został przedstawiony na Rycinie 1.

Rycina 1. Rys historyczny COVID-19 na przestrzeni lat.



1.2 Epidemiologia

Choroba COVID-19, stanowiła i nadal stanowi globalne wyzwanie epidemiologiczne, które pojawiło się w grudniu 2019 roku i szybko przerodziło się w pandemię obejmującą cały świat. Badania epidemiologiczne skupiają się na analizie transmisji wirusa, czynników ryzyka zakażenia, klinicznych manifestacji choroby oraz skuteczności środków zapobiegawczych.

W epidemiologii COVID-19, istotne są badania dotyczące dynamiki rozprzestrzeniania się wirusa, identyfikacja grup ryzyka, skutki społeczne i zdrowotne oraz ocena skuteczności różnych strategii interwencyjnych. Przyjęte środki zapobiegawcze, takie jak zachowanie dystansu społecznego, powszechne noszenie masek, izolacja chorych, masowe testowanie i kampanie szczepień, mają na celu zarządzanie transmisją i minimalizację skutków zdrowotnych.

Wiedza dotycząca choroby pełni kluczową rolę w kształtowaniu decyzji zdrowotnych i politycznych, umożliwiając monitorowanie sytuacji epidemicznej, identyfikację trendów oraz dostosowywanie działań prewencyjnych w zależności od zmieniającej się sytuacji epidemiologicznej. Jest to fundamentalny obszar badawczy w kontekście zarządzania pandemią, wymagający stałego monitorowania i aktualizacji w świetle nowych danych i odkryć naukowych (Tabela 1) [3, 4].

Tabela 1. Najważniejsze aspekty związane z epidemiologią COVID- 19.

| | |
|---|--|
| Kluczowe punkty dotyczące epidemiologii COVID-19 | |
| Pochodzenie wirusa | Wirus SARS-CoV-2, został zidentyfikowany po raz pierwszy w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan, w prowincji Hubei, w Chinach. |
| Szybkość rozprzestrzeniania się | Wirus szybko rozprzestrzenia się drogą kropelkową, głównie podczas kontaktu z zakażonymi osobami, kichania, kaszlu i kontaktu z zanieczyszczonymi powierzchniami. |
| Objawy | Objawy COVID-19 mogą obejmować gorączkę, kaszel, trudności w oddychaniu, utratę smaku i węchu, bóle mięśni, zmęczenie i inne objawy związane z układem oddechowym. |
| Rozprzestrzenianie się bezobjawowe | Osoby objawowe, skąpoobjawowe, w tym także bezobjawowe, mogą przenosić wirusa, co utrudnia kontrolę nad jego rozprzestrzenianiem. |
| Grupy ryzyka | Osoby starsze, osoby z istniejącymi schorzeniami zdrowotnymi, takimi jak choroby serca, cukrzyca czy problemy z układem immunologicznym, są bardziej podatne na ciężki przebieg choroby. |
| Testowanie i diagnostyka | Testy RT-PCR, testy antygenowe są szeroko stosowane w diagnozowaniu zakażenia. Badania obrazowe, takie jak tomografia komputerowa klatki piersiowej, mogą być wykorzystywane do oceny stopnia zaawansowania choroby. |
| Zasady zapobiegania | Zachęcanie do noszenia maseczek, utrzymania dystansu społecznego, częstego mycia rąk i unikania dużych zgromadzeń są kluczowymi środkami zapobiegawczymi. |
| Szczepienia | Globalne wysiłki w celu opracowania i wprowadzenia szczepionek przeciwko COVID-19 miały na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa i zmniejszenie ciężkości zakażeń. |
| Mutacje wirusa | Alfa, Beta, Gamma, Delta, Elipson, Omikron, Eta, Iota, Kappa, Zeta, Mu. |
| Działania rządów i społeczeństw | Rządy na całym świecie wprowadziły różnorodne środki pomagające ograniczać rozprzestrzenianie się wirusa, takie jak lockdown, kwarantannę, ograniczenia podróży, aby kontrolować rozprzestrzenianie się wirusa. |
| Wyzwania globalne: | Pandemia COVID-19 stanowi ogromne wyzwanie dla systemów opieki zdrowotnej, gospodarek światowych i społeczności międzynarodowej, wymagając współpracy na szeroką skalę. |

1.3 Etiologia

Wirusy z rodziny koronawirusów mają pochodzenie odzwierzęce. Powodują choroby o objawach przypominających łagodne przeziębienie, aż po poważne, takie jak ciężki ostry zespół oddechowy (SARS) - ang. severe acute respiratory syndrome, bliskowschodni zespół oddechowy (MERS) - ang. Middle East respiratory syndrome oraz COVID-19 [5].

SARS-CoV-2, czynnik etiologiczny COVID-19, to wirus z rodziny koronawirusów, z rodzaju betakoronawirusów. Wiron składa się z otoczki i jednoniciowego RNA. Wszystkie koronawirusy wykazują podobieństwo w organizacji i ekspresji swojego genomu, który koduje 16 białek niestrukturalnych i 4 białka strukturalne: białko kolca (S), otoczkowe (E), błonowe (M) i nukleokapsyd (N) [6].

Białko S (białko powierzchniowe) odpowiada za interakcję z receptorem znajdującym się na powierzchni komórek gospodarza, białko E (otoczkowe) jest odpowiedzialne m.in. za tworzenie wirionów, białko M (błonowe) stanowi główne białko, tworzące macierz wirusa, natomiast białko N (nukleokapsyd) odpowiada za ochronę dużej części RNA i uczestniczy w replikacji wirusa oraz modyfikacji procesów komórkowych [7].

1.4 Patogeneza

Patogeneza choroby COVID-19, wywoływanej przez wirusa SARS-CoV-2, obejmuje szereg procesów biologicznych i immunologicznych, które prowadzą do wystąpienia objawów i powikłań związanych z tą chorobą.

Wirus SARS-CoV-2 wnika do komórek gospodarza poprzez interakcję białka S (białko kolca) z receptorem ACE2 (enzym konwertujący angiotenzynę 2) znajdujących się na powierzchni komórek, szczególnie tych zlokalizowanych w układzie oddechowym.

Fuzja komórkowa to istotny proces w patogenezie wszystkich infekcji wirusowych. W przypadku zakażenia SARS-CoV-2, podjednostka S1 białka SARS-CoV-2 S (białko kolca) zawierająca domenę wiążącą receptor (RBD), poprzez wiązanie się z receptorem ACE2 uczestniczy w fuzji wirusa z komórką gospodarza. Region białka kolca zwany RBD (receptor binding domain), wykazuje wysoką afinność, czyli silne i specyficzne wiązanie do receptora ACE2, które wspiera efektywne wtargnięcie wirusa do komórki gospodarza. Ponadto, wejście wirusa do komórki jest preaktywowane przez furynę - konwertazę proproteinową, co

zmniejsza zależność SARS-CoV-2 od proteaz komórkowych. To potencjalnie umożliwia wirusowi SARS-CoV-2 efektywne wtargnięcie do komórki, omijając nadzór odpornościowy [8].

Po wnikięciu do komórki, wirus uwalnia swój materiał genetyczny, a następnie wykorzystuje mechanizmy komórkowe do replikacji swojego RNA i produkcji nowych wirionów. Organizm reaguje na zakażenie poprzez aktywację układu odpornościowego. Limfocyty T, B i inne komórki immunologiczne są zaangażowane w zwalczanie zakażonych komórek i neutralizację wirusa.

Wirus może prowadzić do wywołania stanu zapalnego w organizmie, zwłaszcza w płucach. SARS-CoV-2 zakaża komórki, które w reakcji na infekcję uwalniają różne cytokiny, takie jak IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- β , IFN- γ , CXCL-10, MCP-1, MIP-1 (hipercytokinia - zjawisko znane, jako „burza cytokinowa”). To skutkuje aktywacją różnorodnych komórek odpornościowych, włączając neutrofile, limfocyty T pomocnicze oraz cytotoksyczne. Efektem tego jest uszkodzenie obu rodzajów pneumocytów (typu I i II), rozległe uszkodzenie pęcherzyków płucnych. W następstwie prowadzi to do rozwinięcia zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS). W przypadku pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby w badaniach laboratoryjnych obserwuje się także wyczerpanie limfocytów T, limfopenię. [9].

W przeważającej liczbie przypadków, wirus aktywnie replikuje się do około dziesiątego dnia od momentu zakażenia. Z kolei faza dysfunkcji immunologicznej, prowadząca do zmian patologicznych w układzie oddechowym oraz wystąpienia powikłań, ma miejsce od ósmego do czternastego dnia lub dłużej. Charakterystyczny dla zakażenia SARS-CoV-2 jest obraz histopatologiczny uszkodzenia pęcherzyków płucnych, który przypomina uszkodzenie płuc w przypadku innych wirusowych infekcji układu oddechowego, takich jak MERS czy grypa. Dodatkowo, w przypadku COVID-19, obserwuje się także ciężkie uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, przypadki zakrzepicy, mikroangiopatii i angiogenezy [10].

Badania nad COVID-19 są nadal prowadzone, zrozumienie patogeny tej choroby może ulec zmianie w miarę zdobywania nowych informacji naukowych.

1.5 Obraz kliniczny

Objawy mogą się pojawić od 2 do 14 dni po ekspozycji na wirusa. Przebieg choroby jest zróżnicowany, a czas trwania objawów różny. Niektórzy pacjenci przechodzą zakażenie bezobjawowo, inni doświadczają łagodnych objawów przez kilka dni, podczas gdy u innych choroba rozwija się powoli, prowadząc do poważnych komplikacji. Natężenie objawów może zależeć od wielu czynników, takich jak wiek pacjenta, obecność współistniejących schorzeń oraz stopień zaawansowania choroby. Pacjenci z grup ryzyka, są bardziej podatni na rozwinięcie ciężkiego przebiegu choroby, co może prowadzić do powikłań, takich jak zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS). Do często zgłaszanych objawów należą gorączka, kaszel, duszności, zmęczenie, bóle głowy i mięśni, bóle gardła. Pacjenci mogą również doświadczać utraty węchu czy smaku, nudności, biegunki i innych objawów układu pokarmowego [11].

W przypadku ciężkiego przebiegu COVID-19 u chorych może wystąpić zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), którzy w następstwie mogą wymagać intensywnej terapii. Wirus może również wpływać na inne narządy i układy, powodując między innymi powikłania sercowo-naczyniowe, neurologiczne.

Charakterystyka obrazu klinicznego COVID-19 ulegała zmianom wraz z kolejnymi falami pandemii. Objawy zależały między innymi zróżnicowanej patogenności kolejnych wariantów wirusa [12]. Średni okres inkubacji choroby, który dla wcześniejszych wariantów SARS-CoV-2 wynosił 4–5 dni, uległ skróceniu do 3 dni w przypadku nowego wariantu Omikron [13]. Transmisja wirusa po 7–10 dniach od pojawienia się objawów jest mało prawdopodobna nawet, jeśli testy PCR dają dodatni wynik [14]. Zakażenie wariantem Omikron charakteryzuje się łagodniejszym przebiegiem, a odsetek przypadków bezobjawowych jest wyższy niż w przypadku wcześniejszych wariantów, szczególnie Delta [15]. Niemniej jednak, u niektórych pacjentów może dochodzić do ciężkiego przebiegu choroby, który wymaga hospitalizacji i może prowadzić do zgonu. Zakażenie wariantem Omikron rzadziej wiąże się z objawami z dolnych dróg oddechowych w porównaniu z poprzednimi wariantami [16]. Dane z Republiki Południowej Afryki sugerują, że zakażenie wariantem Omikron zmniejsza ryzyko hospitalizacji o 29%, a raporty z Wielkiej Brytanii wskazują na obniżenie ryzyka hospitalizacji o 20–25% i wielodniowej hospitalizacji o 40–45% wśród osób nieszczepionych, które wcześniej nie przebyły infekcji SARS-CoV-2 [17, 18]. Wcześniejsze przebycie zakażenia zmniejsza ryzyko hospitalizacji i wielodniowej

hospitalizacji odpowiednio o 50% i 61% [19]. Objawy zakażenia wariantem Omikron są podobne do tych wywołanych przez poprzednie warianty, ale ich wystąpienie i nasilenie mogą być determinowane nie tylko przez wiek i choroby współistniejące, ale przede wszystkim przez wywiad wcześniejszej infekcji i szczepienie przeciwko COVID-19 [20]. Wyróżnia się 4 stadia choroby.

1.5.1 Stadium I

W pierwszym stadium choroby pacjenci zazwyczaj nie wykazują żadnych objawów lub objawy są łagodne, bez duszności. Poziom nasycenia tlenem hemoglobiny krwi tętniczej, mierzony pulsoksymetrem (SpO₂), wynosi $\geq 94\%$ podczas oddychania powietrzem atmosferycznym, co nie wymaga hospitalizacji. Badania radiologiczne klatki piersiowej nie wykazują istotnych nieprawidłowości w tej fazie choroby. Objawy COVID-19 są różnorodne i często niespecyficzne. Najczęściej występującymi objawami zakażenia wywołanych wariantem Omikron są kaszel, katar, kichanie, ból głowy, zmęczenie, ból gardła i gorączka. Inne objawy, które mogą wystąpić to duszność, trudności w oddychaniu, bóle mięśni lub całego ciała, zapalenie spojówek, utratę apetytu, nudności, wymioty, biegunkę oraz bóle brzucha. Natomiast zaburzenia smaku (ageusia) lub węchu (anosmia) są rzadziej zgłaszane przez chorych. U starszych pacjentów mogą występować wahania temperatury ciała z tendencją do hipotermii, majaczenie oraz ogólne osłabienie, występowanie upadków, mogące poprzedzać pojawienie się objawów związanych z układem oddechowym [21].

Większość osób zakażonych wirusem SARS-CoV-2 (ok. 80%) przechodzi zakażenie bezobjawowo lub z łagodnymi objawami i nie wymagają hospitalizacji. Ten odsetek znacząco wzrósł wraz z rozpowszechnieniem wariantu Omikron, który głównie wywołuje symptomy związane z górnymi drogami oddechowymi. Niemniej jednak istnieje ryzyko, że łagodne objawy mogą być wstępnym sygnałem rozwoju zapalenia płuc, które zazwyczaj występuje w II stadium choroby. Osoby w I stadium choroby, pozostają zazwyczaj pod opieką lekarza podstawowej opieki zdrowotnej, przede wszystkim wymagają oceny stanu zdrowia ogólnego, monitorowania poziomu tlenu we krwi (SpO₂) oraz oceny czynników ryzyka ciężkiego przebiegu COVID-19. Do tych czynników zaliczają się: wiek powyżej 60 lat, otyłość, cukrzyca, choroby nowotworowe, przewlekła niewydolność serca, przewlekła niewydolność oddechowa, przewlekła niewydolność nerek, niedobory odporności oraz stosowanie leków immunosupresyjnych [22].

1.5.2 Stadium II

W drugim stadium choroby pacjenci wykazują łagodne do umiarkowanego zapalenie płuc, stwierdzone na podstawie objawów klinicznych i wyników badań radiologicznych. Poziom SpO₂ spada poniżej 94% podczas oddychania powietrzem atmosferycznym. Często u pacjentów na tym etapie choroby występuje ogólne osłabienie, gorączka, kaszel i duszność oraz inne objawy pozapłucne.

1.5.3 Stadium III

W stadium trzecim, które jest poważną postacią choroby, towarzyszy niewydolność oddechowa objawiająca się dusznością z częstością oddechów powyżej 30 na minutę, oraz SpO₂ poniżej 90% przy oddychaniu powietrzem atmosferycznym [23]. Dodatkowo, w badaniach obrazowych takich jak tomografia klatki piersiowej, obserwuje się rozległe zmiany zapalne w płucach obejmujące ponad 50% pól płucnych. W tym stadium może dojść także do rozwoju burzy cytokinowej, a to stanowi zagrożenie dla ponad 15% chorych [24]. Objawy neurologiczne, obejmujące zarówno centralny, jak i obwodowy układ nerwowy, są powszechne u pacjentów z ciężką infekcją [25]. Mogą występować również ostre choroby mózgowo-naczyniowe, takie jak udar niedokrwienny, krwotok śródmózgowy oraz zakrzepica żył głębokich mózgu. Dodatkowo, pacjenci są narażeni na powikłania psychiatryczne, w tym zaburzenia nastroju lub psychotyczne, lęk i bezsenność [26, 27].

1.5.4 Stadium IV

W stadium czwartym, które jest związane z zespołem ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), rozwijającym się u około 5% chorych, może towarzyszyć także wstrząs septyczny oraz/lub niewydolność wielonarządowa. W tym stadium mogą występować dodatkowe powikłania, takie jak ostre uszkodzenie nerek i wątroby, niedrożność jelit lub niedokrwienie krezki [28]. Pacjenci mogą doświadczać zaburzeń rytmu serca, ostrego zespołu wieńcowego, niewydolności serca, zapalenia mięśnia sercowego oraz niestabilności hemodynamicznej, co obserwuje się u ponad 20% pacjentów przyjmowanych na oddziały intensywnej terapii (OIT). Ryzyko żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ), w tym zatorowości płucnej było na początku pandemii oceniane, jako wysokie u pacjentów na OIT, sięgając niekiedy nawet ponad 30%. Jednakże, nowsze badania wskazują, że ogólne ryzyko żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej u chorych na COVID-19, niezależnie od ciężkości

choroby, jest niższe niż początkowo zakładano, chociaż pozostaje wyższe niż w populacji ogólnej. Około 8% pacjentów cierpiących na COVID-19 doświadcza współistniejących infekcji bakteryjnych lub grzybiczych, które są jednym z głównych czynników zgonu, oprócz ARDS i niewydolności wielonarządowej [29]. Najczęściej izolowanymi patogenami w przypadku towarzyszących nadkażeń są: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Aspergillus fumigatus* [30].

1.6 Diagnostyka

Rozwój diagnostyki COVID-19 na przestrzeni czasu był niezwykle dynamiczny i kluczowy w walce z pandemią. Od momentu wybuchu pandemii, naukowcy, lekarze i instytucje zdrowia publicznego na całym świecie pracowali nad opracowaniem skutecznych i szybkich metod diagnozowania tej choroby.

Różnorodność narzędzi diagnostycznych COVID-19 obejmuje precyzyjne metody identyfikacji obecności wirusa SARS-CoV-2. Wśród nich wymienić można badania metodą PCR, testy antygenowe, badania serologiczne.

1.6.1 Metoda PCR

Metoda PCR to wysoce precyzyjna metoda wykrywania materiału genetycznego wirusa w próbkach z dróg oddechowych, takich jak wymaz z nosa czy gardła.

RT-PCR, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją, to metoda PCR opracowana celem wykrywania materiału genetycznego wirusa (RNA). Jest to szybka i niezawodna technika, dostarczająca wyników w ciągu kilku godzin w sposób o dużej przepustowości [31]. Proces ten obejmuje dwie kolejne reakcje: konwersję RNA w komplementarną DNA (cDNA) za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy oraz amplifikację próbki cDNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy z użyciem specyficznych dla genu starterów i fluorescencją oznaczonych sond hydrolizy.

W pierwszym kroku RNA jest przekształcane w cDNA, tworząc szablony DNA do użycia w drugim kroku. W trakcie drugiego kroku liczba kopii DNA zwiększa się poprzez powtarzające się cykle termiczne. Startery specyficzne dla genu kierują amplifikację wybranych regionów genomu, natomiast fluorescencyjnie oznaczone sondy generują sygnały po udanej amplifikacji obszarów genu, umożliwiając system reakcji ilościowej [32].

Odkrycie metody RT-PCR zrewolucjonizowało wykrywanie transkrypcji genów, umożliwiając identyfikację genów na śladowych poziomach. Ta technika jest powszechnie wykorzystywana w badaniach chorób zakaźnych na całym świecie [33].

Zestawy do wykrywania wirusa SARS-CoV-2 metodą RT-PCR zawierają głównie enzymy odwrotnej transkryptazy i amplifikacji, dwa do trzech zestawów starterów i sond do amplifikacji określonych regionów genomu wirusa, a także reagenty do kontroli negatywnej, pozytywnej i wewnętrznej. Próbkki kontrolne są przetwarzane w taki sam sposób jak próbki pobrane od pacjentów i są załączone do każdego zestawu w zestawach wykrywania o dużej przepustowości. Prawidłowe skonfigurowanie testu PCR, w tym prawidłowe użycie próbek kontrolnych, jest kluczowe dla uzyskania dokładnych i wiarygodnych wyników diagnostycznych. Dzięki monitorowaniu i potwierdzaniu poprawności działania testu za pomocą próbek kontrolnych możliwe jest zapewnienie wysokiej jakości diagnostyki molekularnej. Niektóre zestawy RT-PCR autoryzowane przez EUA (European Union Allowance), mogą przetwarzać około 96 próbek w ciągu około 4 godzin [34].

Podsumowanie metody molekularnej (RT-PCR):

- Wykrywanie RNA SARS-CoV-2, wskazującego na aktywne zakażenie wirusem.

Typy próbek:

- Powszechnie wykonywane są wymazy z nosogardła, pobrana płwocina lub płyn z płukania pęcherzyków oskrzelowych.

1.6.2 Testy antygenowe

Szybkie testy, które identyfikują białka wirusa w badanych próbkach pobranych od pacjentów z aktywną infekcją. Oferują szybkie wyniki, jednak mogą być mniej czułe niż testy PCR.

Antygen może wywołać reakcję układu immunologicznego i indukować produkcję przeciwciał, które zabijają patogeny, chroniąc w ten sposób organizm. Testy antygenowe, w przeciwieństwie do metod opartych na PCR, wykrywają elementy budowy wirusa (takie jak glikoproteina S, białko M lub uwolnione białko N) lub sam wirus bez przejścia etapów termicznej amplifikacji. Podobnie jak metody oparte na PCR, testy antygenowe są przydatne w wykrywaniu tylko aktywnej infekcji wirusowej, a nie procesu powrotu do zdrowia. Testy antygenowe mogą być przeprowadzane na paskach LFA (Lateral flow assay), w celu

szybkiego wykrywania lub testy ELISA dla lepszej czułości i zastosowania dużej przepustowości (w niektórych przypadkach jednoczesny pomiar nawet 96 próbek). Diao i wsp. opracowali barwny test immunochromatograficzny LFA do wykrywania białka nukleokapsydu (N) SARS-CoV-2 [35]. W teście wykorzystuje się przeciwciała mysie anti-N oraz przeciwciała kozie anti-IgG w celu utworzenia odpowiednio linii testu i kontroli. Zamiast konwencjonalnych nanocząstek złota, do oznaczania używa się przeciwciała króliczego anti-N znakowanego karboksylo-modyfikowanymi mikrocząstkami chelatu europu (III) z polistyrenu. Jako próbki użyto wymazów z nosa i gardła oraz próbek moczu. W porównaniu z testami na bazie kwasów nukleinowych, test wykazał czułość na poziomie 68% i specyficzność na poziomie 100% [36].

Testy antygenowe są przydatne do szybkich badań przesiewowych, ale mogą mieć nieco niższą czułość w porównaniu do testów metodą PCR. Te metody diagnostyczne zapewniają kompleksowe podejście do wykrywania zakażeń wirusem SARS-CoV-2, biorąc pod uwagę różne aspekty, takie jak aktualny stan infekcji, reakcję immunologiczną oraz potencjalną odporność. Wybór konkretnego testu zależy od celu testowania, czasu i dostępności zasobów.

Podsumowanie metody testów antygenowych:

- Polega na identyfikacji białek wirusa, w szczególności antygenów SARS-CoV-2, w badanej próbce.

Typy próbek:

- Zazwyczaj testy antygenowe przeprowadzane za pomocą wymazów z nosa lub gardła, pozwalając na szybką i wygodną możliwość wykonania testu na miejscu (punkt pobrań).

1.6.3 Metody serologiczne

Celem badań serologicznych jest ocena miana przeciwciał wskazujących na przebytą infekcję lub odpowiedź immunologiczną po szczepieniu.

Przeciwciało to białko wytwarzane przez układ odpornościowy w odpowiedzi na antygen. Każde przeciwciało posiada miejsca wiążące, które mogą związać tylko jeden konkretny rodzaj antygeny, aby usunąć go z organizmu. Specyficzność ta jest determinowana przez regiony wiążące antygen (ang. antigen-binding regions), zlokalizowane na N-końcu przeciwciała. Przeciwciała są również nazywane immunoglobulinami (Ig). Istnieje pięć klas

przeciwciał: IgM, IgD, IgG, IgA i IgE, które różnią się obszarami C-końcowymi [37]. Przeciwciała są wydzielane w błonie śluzowej i krwi, wiążąc się i dezaktywując antygeny. Neutralizacja przeciwciał zapobiega zakażaniom komórek przez wirusy [38]. Rekombinowany antygen, który imituje wirusa, może być produkowany w laboratorium, a przeciwciała o określonej zdolności wiązania mogą być wytwarzane przy użyciu tych sztucznych patogenów [39]. Najczęściej używane testy serologiczne opierają się na testach metodą przepływu bocznego (LFA) i testach immunoenzymatycznych lub immunoenzymosorpcyjnych (ELISA).

W teście typu LFA obecność badanej cząsteczki jest określana przez przeciwciała unieruchomione na jej membranie. Urządzenie składa się z kasety, która otacza pasek z membrany polimerowej, zawierającej dwie linie: kontrolną i testową. W teście serologicznym typu LFA analizowane są określone przeciwciała zawarte w próbce krwi pacjenta, która jest następnie aplikowana na wkładkę próbki za pomocą portu, a następnie przemieszcza się przez pasek dzięki zjawisku kapilarnemu. W momencie dotarcia do pierwszej linii, przeciwciała oznaczone nanocząstkami złota łączą się z docelową cząsteczką w próbce. Następnie, w trakcie przemieszczania się próbki, przeciwciała oznaczone złotem są wiązane przez przeciwciała pochłaniające w liniach. W momencie przekroczenia granicy wykrywalności testu, nadmiar przeciwciał oznaczonych złotem przemieszcza się dalej wzdłuż paska i jest wychwytywany na linii kontrolnej. To powoduje powstanie kolorowego prążka testowego, który wskazuje wynik dodatni. Nawet w przypadku braku badanej cząsteczki w roztworze próbki, przeciwciała oznaczone złotem muszą być uchwycone na linii kontrolnej, co stanowi kontrolę poprawności przeprowadzenia testu [40]. W zależności od tego, czy test dotyczy przeciwciał klasy IgG, IgM, czy obu, w oknie wyświetlania powinno być widoczne odpowiednio jedno, dwa lub trzy paski. Jeśli test dotyczy tylko jednej klasy przeciwciał i jest ujemny, wyświetla się jeden pasek tylko na linii kontrolnej. Jeśli test jest pozytywny, powinny pojawić się dwa paski - zarówno na linii kontrolnej, jak i linii testowej. Jeśli test dotyczy obu przeciwciał i jest ujemny, powinien ponownie pojawić się jeden pasek na linii kontrolnej. Jeśli jest pozytywny dla obu, pojawią się trzy paski: jeden na linii kontrolnej, jeden na linii testowej dla IgG i jeden na linii testowej dla IgM. Dodatkowo, w teście IgG/IgM może być obecne tylko jedno przeciwciało, co może być pośrednim wskaźnikiem przebiegu zakażenia lub bezpośrednią odpowiedzią immunologiczną.

Korzyści płynące z zastosowania testu LFA w porównaniu z testem ELISA wynikają z możliwości wykorzystania urządzenia w warunkach domowych bez konieczności

przeszkolenia, analogicznie do testów ciążowych przeznaczonych do samodzielnego użytku. Test ELISA to technika diagnostyczna, która może być przeprowadzana jedynie w laboratoriach posiadających uprawnienia do przeprowadzania testów o umiarkowanej lub wysokiej złożoności. Protokół tej metody obejmuje wiele kroków oraz długi czas oczekiwania, wymagając równocześnie wykwalifikowanego personelu i specjalistycznego wyposażenia. W kontekście badań nad SARS-CoV-2 szczególny nacisk kładzie się na poprawę czułości i swoistości testów LFA. W celu zwiększenia dokładności, czułości oraz przepustowości testowania, opracowywane są nowe rozwiązania, takie jak modyfikacje badania zwiększające czułość i testy typu multiplex. Zwłaszcza w obszarach o ograniczonych zasobach finansowych oraz infrastrukturalnych, brak wczesnej diagnozy prowadzi do nierozpoznania wielu przypadków, co z kolei skutkuje niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się wirusa. W takim kontekście testy LFA typu multiplex stają się niezbędne do jednoczesnego badania wielu biomarkerów, co pozwala na redukcję zużywanych reagentów, czasu oczekiwania oraz kosztów pracy. Warto jednak zauważyć, że obie metody diagnostyczne napotykają na pewne trudności i ograniczenia.

Głównym wyzwaniem dotyczącym testów serologicznych jest zjawisko krzyżowej reaktywności. Reakcje krzyżowe występują, gdy przeciwciała łączą się z antygenem innym niż antygen docelowy, często z powodu podobieństw między cząsteczkami. Zjawisko krzyżowej reaktywności zaobserwował Okba i in. dla białka kolca (S) SARS-CoV-2 z białkami S SARS-CoV i MERS-CoV [41]. Jednakże, nie zaobserwowano krzyżowej reaktywności dla podjednostki S1 białka kolca i MERS-CoV. Największym problemem związanym z krzyżową reaktywnością jest to, że może prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników: pacjent wcześniej zainfekowany SARS-CoV może uzyskać pozytywny wynik dla SARS-CoV-2, chociaż nie przechodzi obecnie aktywnej infekcji. Dodatkowo, przeciwciała są produkowane w trakcie infekcji i negatywny wynik testu może nie potwierdzić, że pacjent jest zakażony. Większość pacjentów wytwarza przeciwciała po około 14 dniach w odpowiedzi na zakażenie SARS-CoV-2, podczas gdy niedawne badanie pokazuje, że zarówno przeciwciała IgG, jak i IgM, były wykrywane pięć dni później [39, 42]. Ta ogólna późna odpowiedź może prowadzić do fałszywie ujemnych wyników: gdy pacjent jest zainfekowany, ale nie wytworzył jeszcze przeciwciał w wykrywalnych ilościach. Dlatego też istotne jest ustalenie wartości czułości i swoistości testów, aby ocenić prawdopodobieństwo fałszywych wyników dodatnich i ujemnych. Czułość to procent prawdziwie pozytywnych wyników wśród wszystkich pozytywnych wyników, a swoistość to procent prawdziwie negatywnych

wyników wśród wszystkich negatywnych wyników [43]. Z drugiej strony, ze względu na późne wykrycie przeciwciał, badania serologiczne mogą być retrospektywnie korzystne w badaniach nad szczepionkami, badaniach epidemiologicznych i późnych powikłaniach, gdzie testy RT-PCR mogą dawać fałszywie ujemne wyniki ze względu na wydalanie lub niskie obciążenie wirusem w badanych próbkach [44]. Kundu i wsp. twierdzą, że badania serologiczne nie mogą powiedzieć, kto jest zakażony, ponieważ przeciwciała generują się nawet do dwóch tygodni od początku objawów, gdy wirus powinien zostać wyeliminowany z organizmu. Jednakże, może odpowiedzieć na pytania, kto rozwinął odporność na wirusa i jaki odsetek populacji był zakażony [45, 46].

Podsumowanie metod serologicznych:

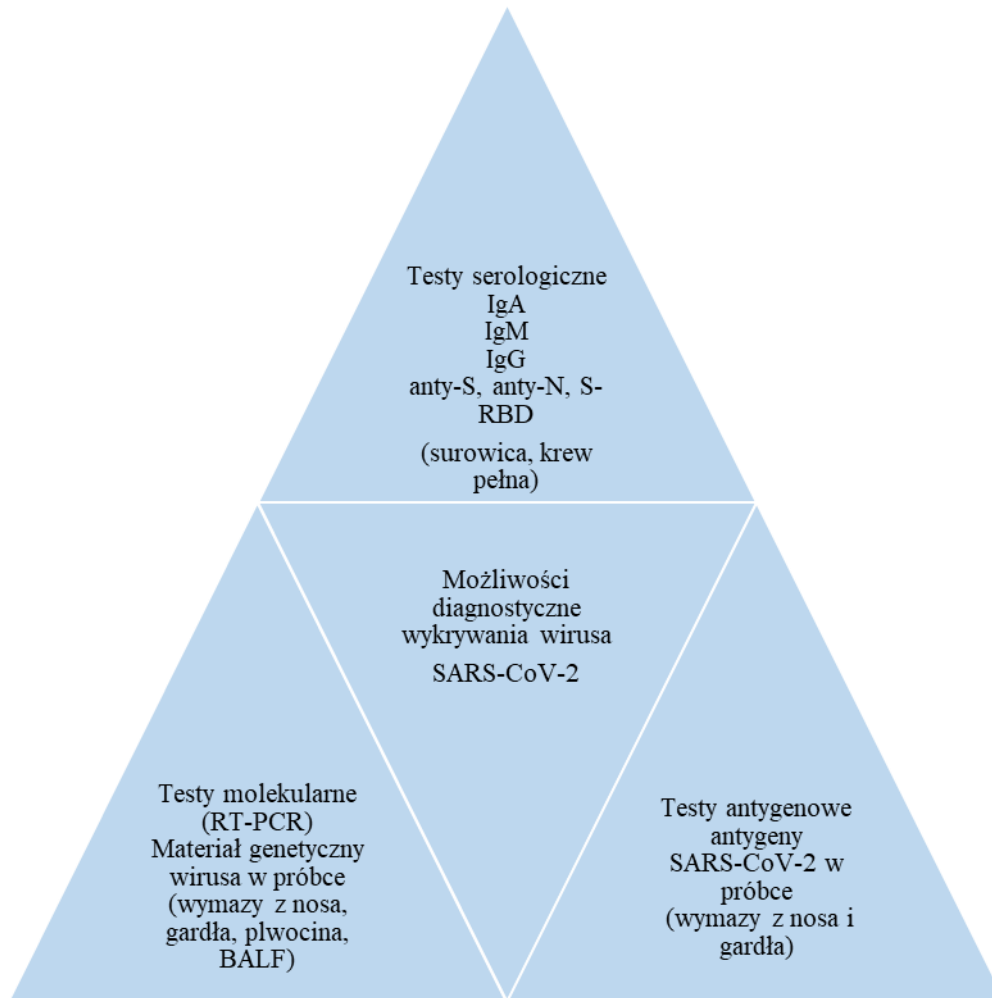
- Metody serologiczne służą wykrywaniu różnych rodzajów przeciwciał przeciwko wirusowi SARS-CoV-2

Typy próbek:

- próbka surowicy lub osocza krwi pacjenta

Powszechnie dostępne możliwości diagnostyczne wykrywania wirusa SARS-CoV-2 przedstawiono na Rycinie 2.

Rycina 2. Możliwości diagnostyczne wykrywania wirusa SARS-CoV-2.



1.6.4 Badania radiologiczne

Jeśli istnieją objawy kliniczne wskazujące na zajęcie płuc, takie jak utrzymujący się kaszel oraz spadek poziomu saturacji krwi tętniczej, zaleca się przeprowadzenie badań obrazowych płuc. Badaniem pierwszego rzutu jest badanie rentgenowskie (RTG) klatki piersiowej, choć ma on niższą skuteczność diagnostyczną niż tomografia komputerowa (TK). Ostateczna decyzja o wyborze metody obrazowania powinna być podejmowana w zależności od stanu klinicznego pacjenta oraz dostępnych zasobów organizacyjnych [47].

W sytuacji, kiedy objawy w przebiegu COVID-19 nasilają się, a wskaźniki wymiany gazowej pogarszają się, badanie RTG płuc może być przydatne do rozróżnienia między progresją COVID-19 a innymi stanami, które mogą być przyczyną problemów z wymianą gazową, takimi jak samoistna odma opłucnowa, jako możliwe powikłanie COVID-19.

W przypadku pacjentów w ciężkim stanie, szczególnie tych wymagających wentylacji mechanicznej, u których istnieje konieczność oceny stanu płuc, zalecane jest wykonanie badania rentgenowskiego płuc w pozycji leżącej wykonywane przyłóżkowo.

W objawowym COVID-19, przebiegającym bez postępującej niewydolności oddechowej, należy ograniczyć wykonywanie kontrolnych badań RTG klatki piersiowej do sytuacji, w których wynik badania może mieć istotny wpływ na dalsze postępowanie terapeutyczne u pacjenta [48].

Rousan i wsp. zaobserwowali, że badania RTG klatki piersiowej wykonywane na wczesnym etapie choroby, najczęściej wykazywały zmiany typu matowej szyby. Konsolidacje częściej występowały w drugim tygodniu choroby, następnie wykazując regresję do postaci zmian typu matowej szyby. W drugim tygodniu zaobserwowali także zmiany mieszane siateczkowate, o charakterze konsolidacji, matowej szyby i pogrubienia przegród międzypłatowych. Badania rentgenowskie, które nie uwidaczniały uchwytanych zmian badacze obserwowali w miarę poprawy klinicznej pacjentów [49].

1.6.5 Tomografia komputerowa

Przed rozważeniem konieczności skierowania pacjenta z COVID-19 na badanie TK (tomografii komputerowej, istotne jest dokładne zastanowienie się nad korzyściami oraz potencjalnymi niedogodnościami związanymi z tym badaniem, włączając w to dawkę promieniowania, jaką pacjent otrzyma podczas badania. Należy unikać rutynowego wykonywania badań TK, jako metod skринingowych u pacjentów bez objawów lub z łagodnymi objawami, którzy są leczeni ambulatoryjnie.

Badanie TK wykazuje wysoką czułość w diagnozowaniu COVID-19, jednak jego swoistość jest ograniczona. Mimo że niektóre zmiany mogą być interpretowane, jako niezwiązane z COVID-19, to w połączeniu z pełną oceną kliniczną może pomóc w ustaleniu wstępnego rozpoznania choroby. W szczególnych sytuacjach, takich jak długi czas oczekiwania na wynik testu RT-PCR, podejrzenie wyniku fałszywie ujemnego, lub wystąpienie silnych objawów klinicznych sugerujących COVID-19, rozważenie wykonania TK może być uzasadnione, o ile pomoże to w decyzji o dalszym postępowaniu z pacjentem [50].

W stadium objawowym, gdy nie występuje niewydolność oddechowa, tomografia komputerowa jest bardzo czuła w wykrywaniu zmian wewnętrznych i może dostarczyć

istotnych informacji o dynamice tych zmian. Kliniczna ocena efektywności wymiany gazowej w połączeniu z wynikami TK może stanowić istotne narzędzie prognostyczne.

TK klatki piersiowej jest zalecane także u pacjentów z COVID-19, u których istnieje podejrzenie wystąpienia powikłań, takich jak ropniak czy ropień płuc, lub przy współistnieniu innych schorzeń, takich jak zatorowość płucna.

Typowe zmiany uwidaczniane badaniem TK klatki piersiowej u chorych na COVID-19:

- Pojawiające się zazwyczaj obustronnie, zagęszczenia o wyglądzie matowej szyby, które mogą być obecne, wraz z obszarami konsolidacji i pogrubieniem przegród międzyzrazikowych, tworzące wygląd podobny do kamienia brukowego.
- Wiele miejscowych, okrągłych zagęszczeń o wyglądzie matowej szyby.
- Widoczny obraz tzw. "odwróconego halo" lub inne charakterystyczne zmiany typowe dla rozwijającego się stanu zapalnego płuc (obserwowane w późniejszym stadium choroby) [51].

Do oceny stopnia zaawansowania zmian w płucach wykorzystuje się różne skale (ocena procentowa lub w formie punktacji, określająca rozległość zmian chorobowych w płucach), które umożliwiają radiologom ocenę stopnia zajęcia poszczególnych obszarów anatomicznych. Dodatkowo stosuje się komputerowe narzędzia, takie jak specjalistyczne oprogramowanie, które umożliwiają analizę procentowego zajęcia płuc. Lin i wsp. opracowali metodę z zastosowaniem sztucznej inteligencji (AI), który umożliwia różnicowanie między COVID-19 a pozaszpitalnym zapaleniem płuc o innej etiologii na podstawie obrazów tomografii komputerowej klatki piersiowej. Wyniki przedstawione przez chińskich badaczy sugerują, że metody oparte na sztucznej interligencji, wykorzystujące model sieci konwolucyjnych, posiadają zdolność do skutecznego rozróżniania obu tych schorzeń [52].

1.6.6 Badania laboratoryjne krwi

Badania laboratoryjne krwi w kontekście COVID-19 stanowią kluczowy element monitorowania pacjentów i oceny wpływu wirusa na różnorodne parametry fizjologiczne. Szczegółowa analiza tych badań dostarcza cennych informacji na temat stanu zdrowia pacjenta oraz ewolucji choroby [53].

Pierwszym kluczowym parametrem jest pełna morfologia krwi. Wzrost liczby leukocytów, zwłaszcza neutrofilów może wskazywać na aktywną infekcję, natomiast

zmniejszenie liczby limfocytów, zwłaszcza limfocytów T, może być związane z reakcją immunologiczną na obecność wirusa.

Badania białek zapalnych, takich jak CRP (białko C-reaktywne) czy interleukina-6 (IL-6), dostarczają informacji na temat stopnia aktywacji układu immunologicznego. Wartości te są istotne w ocenie stopnia stanu zapalnego w organizmie pacjenta. Interleukina-6 odgrywa istotną rolę w reakcji zapalnej organizmu i może być związana z ciężkimi przypadkami COVID-19. Wirus SARS-CoV-2 może prowadzić do nadmiernego uwalniania IL-6, co w efekcie może przyczynić się do tzw. „burzy cytokinowej”, czyli szkodliwej reakcji zapalnej organizmu. W niektórych przypadkach wysokie stężenia IL-6 zostały związane z nasileniem stanu zapalnego, uszkodzeniem narządów i ciężkim przebiegiem choroby COVID-19. Blokowanie działania IL-6 za pomocą leków takich jak tocilizumab może być rozważane w leczeniu pacjentów z ciężką postacią COVID-19 [54].

Również stężenie prokalcytoniny może być mierzone w celu różnicowania między zakażeniem wirusowym a bakteryjnym. Nadkażenia bakteryjne mogą występować, jako współistniejące lub wtórne infekcje u pacjentów z COVID-19. Zakażenie wirusem SARS-CoV-2 może osłabić naturalną odporność organizmu, co może sprzyjać rozwojowi infekcji bakteryjnych. Dodatkowo, pacjenci hospitalizowani z powodu COVID-19 często są narażeni na czynniki ryzyka zakażeń szpitalnych, co zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia nadkażenia bakteryjnego.

Aktywność enzymów wątrobowych, takich jak asparaginianotransferaza (AST) i alaninotransferaza (ALT), są monitorowane, aby ocenić ewentualne uszkodzenia wątroby w wyniku infekcji. Oznaczenie stężenia D-dimerów pomaga zidentyfikować aktywację układu krzepnięcia, co może wiązać się z ryzykiem powikłań zakrzepowych.

Elektrolity, takie jak sód, potas czy magnez, podlegają szczególnej obserwacji u pacjentów hospitalizowanych z powodu COVID-19.

Analiza stężenia kreatyniny i mocznika pozwala na ocenę funkcji nerek, co jest istotne, zwłaszcza u pacjentów z cięższym przebiegiem choroby, u których należy modyfikować dawki leków w zależności od funkcji narządu.

1.7 Leczenie

1.7.1 Leczenie w I stadium choroby

Nie należy rutynowo podawać leków przeciwwirusowych wszystkim pacjentom na pierwszym etapie choroby. Leki, które blokują namnażanie się wirusa, takie jak molnupirawir, nirmatrelwir/rytonawir oraz remdesiwir, powinny być stosowane do piątego dnia od pojawienia się objawów w pierwszym stadium u pacjentów, którzy spełniają kryteria ryzyka ciężkiego przebiegu choroby. W przypadku pacjentów z potwierdzoną immunosupresją, wynikającą z choroby lub stosowanej terapii, czas rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego może być wydłużony do 10 dni, zakładając, że wirus będzie replikował przez dłuższy czas. Żaden z tych leków nie jest zalecany dla kobiet w ciąży i karmiących, z uwagi na brak badań klinicznych dla tej grupy pacjentów [55].

Terapia przeciwwirusowa jest szczególnie zalecana u pacjentów z ryzykiem ciężkiego przebiegu COVID-19 opisanych w stadium pierwszym. Ze względu na potencjalne ryzyko i ograniczenia związane z charakterystyką tych leków, powinny być one stosowane pod ścisłym nadzorem lekarza, zwłaszcza unikając stosowania u kobiet w ciąży i matek karmiących piersią.

Molnupirawir i nirmatrelwir/rytonawir są lekami doustnymi stosowanymi 2 razy dziennie przez 5 dni. Molnupirawir jest obecnie rzadko stosowany z powodu małej aktywności względem dominującego obecnie szczepu wariantu Omikron. Remdesiwir jest lekiem w stosowanym w formie dożylniej, zaleca się go podawać u pacjentów, którzy nie wymagają tlenoterapii. U pacjentów niewymagających hospitalizacji, wykazano, że terapia trzydniowa jest wystarczająca [56]. Stosowanie wymienionych leków przeciwwirusowych znacząco zmniejsza ryzyko hospitalizacji i ciężkiego przebiegu COVID-19 u osób obciążonych czynnikami ryzyka.

Czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia ciężkiego przebiegu COVID-19:

- Zaawansowany wiek, zwłaszcza powyżej 60 lat
- Nadmierna masa ciała (otyłość)
- Cukrzyca
- Choroby nowotworowe

- Przewlekła niewydolność serca
- Przewlekła niewydolność oddechowa
- Przewlekła niewydolność nerek
- Niedobory odporności lub stosowanie leków immunosupresyjnych

Osoby z łagodnymi objawami infekcji dróg oddechowych, takich jak niewysoka lub krótkotrwała gorączka, bóle głowy, gardła, mięśniowo-stawowe, lub katar, bez widocznych objawów choroby płuc lub współistniejących chorób pogarszających rokowanie, zazwyczaj nie wymagają leczenia farmakologicznego, lecz jedynie regularnego monitorowania stanu zdrowia.

W ramach leczenia objawowego, pacjenci mogą potrzebować stosowania leków w przypadku wystąpienia gorączki (najlepiej niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) lub paracetamolu). Osobom z nasilonym suchym kaszlem, utrudniającym mówienie i sen, zaleca się stosowanie leków przeciwkaszlowych, np. z kodeiną. Dla dorosłych pacjentów z łagodnym lub umiarkowanym przebiegiem COVID-19 zaleca się również stosowanie wziewnego budezonidu w dawce 800 µg dwa razy dziennie [57]. W tym stadium choroby nie zaleca się podawania glikokortykosteroidów (GKS) w formie doustnej lub dożylnego podania, ze względu na ich działanie immunosupresyjne, które może nasilać i wydłużać czas replikacji wirusa, co może prowadzić do pogorszenia rokowania [58].

Brakuje wystarczających danych, aby rutynowo zalecać stosowanie leków przeciwzakrzepowych w COVID-19 u pacjentów niehospitalizowanych. Zaleca się stosowanie heparyny drobnocząsteczkowej (HDCz) w dawce profilaktycznej u chorych przewlekle unieruchomionych i u tych z innymi, niezwiązanymi z COVID-19, wskazaniami do profilaktyki przeciwzakrzepowej, zwłaszcza u osób z czynnikami ryzyka wystąpienia zakrzepicy żył głębokich lub zatorowości płucnej [59]. Antybiotyki należy stosować jedynie w przypadku uzasadnionego podejrzenia rozwoju towarzyszącej infekcji bakteryjnej, ponieważ nie udowodniono ich skuteczności w leczeniu COVID-19. Nie ma również uzasadnienia dla stosowania profilaktycznej tlenoterapii domowej we wczesnej fazie choroby. Wystąpienie konieczności tlenoterapii związane jest z gwałtownym pogorszeniem stanu klinicznego stanowi bezwzględne wskazanie do hospitalizacji.

1.7.2 Leczenie w II stadium choroby

W momencie zaobserwowania u pacjenta narastającej duszności, gdy poziom saturacji tlenu (SpO₂) spada poniżej 94%, konieczna jest tlenoterapia, co wiąże się z koniecznością hospitalizacji. Zazwyczaj na tym etapie choroby wystarczająca jest tlenoterapia o niskim przepływie, nieprzekraczająca 15 l/min. Profilaktyczne dawki heparyny drobnocząsteczkowej (HDCz) są rutynowo zalecane do stosowania u pacjentów hospitalizowanych, a w odpowiednio uzasadnionych przypadkach można zwiększyć ich dawkę do terapeutycznej [60].

Pierwszym lekiem przeciwwirusowym, który został zarejestrowany i wykazał skuteczność w zwalczaniu SARS-CoV-2 u dorosłych oraz u dzieci powyżej 12 roku życia, jest remdesiwir. W przypadku chorych hospitalizowanych zaleca się podawanie remdesiwiru we wlewie dożylnym w dawce 200 mg pierwszego dnia, a następnie 100 mg przez kolejne 4 dni. Głównym przeciwwskazaniem do stosowania tego leku jest niewydolność nerek z eGFR poniżej 30 ml/min. Leczenie remdesiwirem należy przerwać, jeśli aktywność ALT przekroczy pięciokrotnie górną granicę normy [61]. Alternatywą dla remdesiwiru (Veklury), był molnupirawir (Lagevrio), który można było przyjmować doustnie w dawce 800 mg dwa razy dziennie przez 5 dni, lub nirmatrelwir/rytonawir (Paxlovid), który obecnie podaje się doustnie w dawce 300/100 mg dwa razy dziennie przez 5 dni. Nirmatrelwir/rytonawir są przeciwwskazane do stosowania u pacjentów z ciężką niewydolnością wątroby oraz u osób z niewydolnością nerek i eGFR poniżej 30 ml/min; u osób z eGFR 30–60 ml/min można stosować lek w dawce zredukowanej do 150/100 mg dwa razy dziennie. Ponadto, lek ten jest inhibitorem CYP3A, więc konieczna jest ocena ryzyka interakcji z innymi lekami według ChPL [62]. Żaden z tych trzech leków przeciwwirusowych nie został zatwierdzony do stosowania u kobiet w ciąży i karmiących. Z uwagi na mechanizm działania molnupirawiru i jego potencjalne, choć niepotwierdzone badaniami klinicznymi działanie mutagenne, należy szczególnie zwrócić uwagę na skuteczną antykoncepcję w przypadku stosowania u kobiet w wieku rozrodczym.

1.7.3 Leczenie w III stadium choroby

W przypadku nasilających się objawów u pacjentów w drugim tygodniu choroby, takich jak narastająca duszność i obniżenie SpO₂ poniżej 90%, kwalifikujących się do III stadium choroby, należy stosować tlenoterapię oraz rozważyć zastosowanie tlenoterapii wysokoprzepływowej do 60 l/min.

W sytuacji stwierdzenia u pacjenta podwyższonego stężenia IL-6 powyżej 100 pg/ml, w leczeniu należy rozważyć podanie tocilizumabu (RoActemra) - przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciw receptorowi IL-6. Jest to działanie, które znacząco zmniejsza ryzyko konieczności zastosowania mechanicznej wentylacji oraz zgonu pacjenta [63].

Tocilizumab należy podawać wyłącznie we wlewie dożylnym, w pojedynczej dawce zależnej od masy ciała, nie przekraczając jednak 800 mg (po uprzednim indywidualnym dostosowaniu dawki m.in. w zależności od parametrów funkcji nerek, wątroby). W przypadku braku efektu, można rozważyć podanie kolejnej dawki po 8–24 godzinach, choć nie ma pewności, co do skuteczności podania drugiej dawki leku. Należy unikać podawania tocilizumabu pacjentom, u których liczba neutrofilów spada poniżej 2000/ μ l, liczba płytek krwi poniżej 50 000/ μ l lub gdy aktywność ALT przekracza pięciokrotnie górną granicę normy [64].

W razie potrzeby stosowania GKS, rozpoczęcie terapii deksametazonem powinno nastąpić dopiero po zastosowaniu tocilizumabu, w przypadku braku korzystnego efektu lub jeśli tocilizumab nie był podawany w ogóle [65].

1.7.4 Leczenie w IV stadium choroby

Pogorszenie się stanu klinicznego pacjenta związane z ostrym zespołem niewydolności oddechowej (ARDS) prowadzi do sytuacji, w której tlenoterapia wysokoprzepływowa jest nieskuteczna, a konieczna staje się intubacja i respiratoroterapia. W przypadku tych pacjentów zauważono największe korzyści ze stosowania glikokortykosteroidów [66]. Warto także rozważyć wczesne zastosowanie tocilizumabu, szczególnie u pacjentów z wysokimi poziomami IL-6 lub CRP. Nie wykazano korzyści z rozpoczynania lub kontynuowania terapii przeciwwirusowej u pacjentów poddawanych mechanicznej wentylacji. W takich przypadkach należy zastosować strategię wentylacji

oszczędzającej płuca, która polega na podawaniu małych objętości oddechowych, odpowiednich wartości dodatniego ciśnienia końcowo-oddechowego (PEEP) oraz dostosowywaniu zawartości tlenu w mieszaninie oddechowej do poziomu tlenu we krwi tętniczej i saturacji tlenu. Dla niektórych chorych, którzy nie reagują na standardowe metody leczenia i respiratoroterapii, korzystne może być przejście na wentylację w pozycji odwróconej, czyli na brzuchu [67]. Śmiertelność pacjentów z COVID-19, którzy wymagają mechanicznej wentylacji, wynosi do 67% [68].

1.8 Powikłania, „zespół post-COVID-19” i „Long- COVID”

Już po kilku miesiącach od rozpoczęcia pandemii zaczęto raportować późne, wielonarządowe objawy u osób, które przebyły COVID-19. Aktualnie, jest to istotny problem w obszarze medycznym i zdrowia publicznego na całym świecie [69]. Definicja zespołu post-COVID-19 dotyczy dolegliwości z różnych narządów lub układów, które utrzymują się dłużej niż 3 tygodnie po ostrej fazie zakażenia SARS-CoV-2 [70]. Najczęściej dotyczy objawów, które według Światowej Organizacji Zdrowia, trwają dłużej niż trzy miesiące od momentu zachorowania [71, 72].

Długotrwałe powikłania po COVID-19 stanowi istotny problem w sferze medycznej i zdrowia publicznego na całym globie. Wiele raportów potwierdza długoterminowe konsekwencje COVID-19 w postaci objawów związanych z układem oddechowym, sercowo-naczyniowym, neurologicznym, nerkowym, hematologicznym, żołądkowo-jelitowym, endokrynologicznym i psychospołecznym [73]. Konieczne jest kontrolowanie pacjentów po ostrej fazie COVID-19 w celu rozpoznania i leczenia potencjalnych późnych, wielonarządowych konsekwencji po zakażeniu wirusem SARS-CoV-2.

1.8.1 Układ oddechowy

Uszkodzenie funkcji układu oddechowego podczas COVID-19 wynika głównie z uszkodzenia nabłonka płuc i naczyń krwionośnych. Infekcja wirusem SARS-CoV-2 powoduje nadmierną ekspresję receptora hACE2-R, co prowadzi do zmian zapalnych w płucach i zakłóceń w układach kinina-kalikreina oraz renina-angiotensyna, co zwiększa ryzyko zakrzepicy [74]. Intensywna terapia tlenowa i mechaniczna wentylacja mogą też pogłębiać uszkodzenia płuc. Proces naprawy tkanki płucnej, obejmujący różne szlaki

molekularne, może prowadzić do ich włóknienia, co zmniejsza zdolność do wymiany gazowej i może skutkować rozwinięciem przewlekłej niewydolności oddechowej [75, 76].

1.8.2 Układ nerwowy

Istnieją różne teorie wyjaśniające, w jaki sposób COVID-19 wpływa na układ nerwowy. Jedną z głównych koncepcji jest możliwość, że wirus SARS-CoV-2 dostaje się do mózgu poprzez krwiobieg lub zakażone limfocyty. Istnieje również sugestia, że wirus może dostać się do mózgu przez nos lub nerwy obwodowe [77]. Zainfekowanie ośrodkowego układu nerwowego, nasilone przez nadmierną reakcję immunologiczną, szczególnie przez interleukinę 6 (IL-6), prowadzi do uszkodzenia neuronów, naczyń krwionośnych i może przyczynić się do stanu zapalnego naczyń oraz przewlekłej niedotlenienia.

Badania wskazują, że objawy neurologiczne u osób z długotrwałym przebiegiem COVID-19 obejmują problemy z funkcjami poznawczymi, takie jak dezorientacja (zwana „mgłą mózgową”), trudności z koncentracją, bóle głowy, zaburzenia snu, neuropatię obwodową, zawroty głowy, depresję i lęki [74]. Pacjenci z "mgłą mózgową" opisują uczucie spowolnienia myślenia, dezorientacji lub trudności w kontakcie z rzeczywistością. Osoby, które przeszły COVID-19, często doświadczają trudności z koncentracją uwagi [78].

1.8.3 Układ krążenia

W przypadkach ciężkiego przebiegu COVID-19, uogólniona reakcja zapalna oraz wysoki poziom cytokin i mediatorów immunologicznych, takich jak IL-6 i TNF- α , mogą przyczyniać się do uszkodzenia mięśnia sercowego. Zwiększona obecność receptorów hACE2 w mięśniu sercowym umożliwia także wirusowi przeniknięcie do komórek serca. Dodatkowo, infekcja wirusem może prowadzić do procesów włóknienia mięśnia sercowego. U osób z istniejącymi schorzeniami sercowo-naczyniowymi, starszymi i kobietami, reakcja organizmu na COVID-19 może powodować uszkodzenie serca, a nawet śmierć. Badania pokazują, że u większości pacjentów, którzy mieli ciężki przebieg COVID-19, po wypisie ze szpitala, występują zaburzenia pracy serca u blisko 80%, zapalenie mięśnia sercowego u 60%, a zmiany w strukturze komór serca u prawie 30% z nich [73].

1.9 Profilaktyka

Profilaktyka COVID-19 obejmuje różnorodne działania, a jednym z kluczowych elementów jest program szczepień. W przestrzeni lat, szczepienia przeciwko COVID-19 ewoluowały, dostosowując się do zmieniającej się sytuacji epidemiologicznej i pojawiania się nowych wariantów wirusa.

1.9.1 Początkowe badania i zatwierdzenie szczepionek (2020-2021):

W początkowej fazie pandemii przeprowadzono intensywne badania nad skutecznymi szczepionkami. Pierwsze szczepionki, takie jak szczepionka Pfizer-BioNTech i Moderna, otrzymały zatwierdzenie od odpowiednich agencji regulacyjnych. Rozpoczęto wówczas masową kampanię szczepień w wielu krajach na całym świecie.

1.9.2 Kampanie masowych szczepień (2021-2022):

Szczepienia stały się powszechne, a wiele krajów rozwijało programy szczepień, aby osiągnąć jak największy odsetek osób zaszczepionych. Rozpoczęto szczepienia grup priorytetowych, takich jak personel medyczny, osoby starsze i osoby z grup podwyższonego ryzyka na zachorowanie.

1.9.3 Przystosowanie szczepionek do poszczególnych wariantów wirusa (2022-2023):

W miarę pojawiania się nowych wariantów wirusa, producenci szczepionek dostosowali formuły, aby zwiększyć skuteczność przeciwko nowym odmianom. Wprowadzenie ewentualnych ulepszonych lub dostosowanych szczepionek.

1.9.4 Rozszerzanie Zakresu Szczepień (2023-obecnie):

Stopniowe zwiększanie dostępności szczepień dla szerszych grup społeczeństwa, w tym dzieci i młodzieży. Prowadzono kampanie uświadamiające i edukacyjne, aby zwiększyć zaufanie do szczepień ochronnych.

1.9.5 Badania naukowe i nowe technologie w zakresie szczepień:

Trwają badania nad długotrwałym działaniem szczepionek, koniecznością ewentualnych dawek przypominających oraz skutecznością wobec nowych wariantów.

Profilaktyka COVID-19 za pomocą szczepień jest dynamicznym procesem, który obejmuje ciągłe dostosowywanie strategii do zmieniającej się sytuacji epidemiologicznej i naukowym postępom. Kampanie szczepień odgrywają kluczową rolę w ograniczaniu rozprzestrzeniania się wirusa i zmniejszaniu ciężkości zachorowań [79].

2. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniu SARS-CoV-2

Odpowiedź immunologiczna polega na wytwarzaniu przeciwciał IgA, IgM i IgG we krwi. Powszechnie dostępne testy serologiczne wykrywają przeciwciała przeciwko białku S i N. Przeciwciała przeciwko białku S neutralizują wirusa oraz stanowią ochronę przed zachorowaniem. Natomiast przeciwciała przeciwko białku N wskazują jedynie kontakt z wirusem.

Jak wspomniano w rozdziale 1, badania serologiczne odgrywają bardzo istotną rolę w diagnostyce COVID-19. Przy pomocy badań serologicznych wykrywa się następujące typy przeciwciał (Tabela 2).

Tabela 2. Typy i charakterystyka przeciwciał badanych przy pomocy badań serologicznych.

| Typ przeciwciał | Charakterystyka |
|-----------------------|---|
| IgA | Badanie miana IgA dostarcza informacji o odpowiedzi immunologicznej w błonach śluzowych w kontekście SARS-CoV-2. |
| IgM | Wykrywanie IgM wskazuje na niedawne zakażenie i wczesną odpowiedź immunologiczną. |
| IgG | Ocena IgG informuje o wcześniejszej odpowiedzi immunologicznej i potencjalnej odporności. |
| Anty-S, Anty-N | Badanie przeciwciał przeciwko białkom wirusa, w tym białku kolca (S) i nukleokapsydowemu (N). |
| S-RBD | Wykrywanie przeciwciał przeciwko domenie wiążącej receptory (RBD) białka kolca, kluczowej dla przenikania wirusa. |

Testy mogą być przeprowadzane z użyciem osocza, surowicy lub krwi pełnej, co pozwala na elastyczność w pobieraniu materiału do badania.

Dzięki różnym rodzajom przeciwciał wykrywanych w trakcie zakażenia SARS-CoV-2 możliwe jest określenie stadium infekcji. Występowanie przeciwciał u ozdowieńców i zaszczepionych osób jest różne (ozdowieńcy posiadają przeciwciała przeciwko białkom S i N wirusa, podczas gdy osoby zaszczepione obecnymi szczepionkami posiadają jedynie przeciwciała przeciwko białku S) [80]. Poszczególne rodzaje przeciwciał mogą być przydatne w różnych sytuacjach klinicznych, które przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka typów przeciwciał produkowanych u osób po zakażeniu/szczepieniu*.

| Typy przeciwciał | Ozdowieńcy po COVID-19 | Zaszczepieni przeciwko COVID-19 | Zaszczepieni ozdowieńcy |
|------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| anty-S | + | + | + |
| anty-N | + | - | + |

* Osoby zaszczepione szczepionkami opartymi na białku S wirusa SARS-CoV-2 (szczepionki: Pfizer/BioNTech, Moderna, AstraZeneca).

Przeciwciała w klasie IgA i IgM są wczesnym wskaźnikiem zakażenia (są wykrywalne około 1-2 tygodni od początku choroby), natomiast przeciwciała w klasie IgG są istotnym wskaźnikiem niedawnego i przebytego zakażenia (pojawiają się około 2-4 tygodni od początku choroby) [81]. Macedo i wsp. opisali, że większość pacjentów uzyskuje serokonwersję około 7 do 11 dni po zakażeniu, ale u niektórych pacjentów przeciwciała IgG mogą być produkowane wcześniej. Stężenie przeciwciał IgG w surowicy może wzrosnąć jednocześnie lub wcześniej niż przeciwciała klasy IgM [82]. Mallano i wsp. potwierdzili, że testy serologiczne mogą być przydatne w potwierdzaniu zakażenia metodami diagnostyki molekularnej w niektórych przypadkach, zwłaszcza po około 5 dniach od początku objawów w przypadku wczesnego wytwarzania przeciwciał klasy IgG [83].

Ocena serologiczna występowania przeciwciał nie może zastąpić bezpośredniego wykrywania fragmentów genomu wirusa za pomocą metody PCR [84]. Po około tygodniu po

wystąpieniu objawów COVID-19, prawdopodobieństwo wykrycia materiału genetycznego wirusa SARS-CoV-2 stopniowo maleje, zwłaszcza w przypadku łagodnego przebiegu zakażenia. Testy wykrywające przeciwciała zaczynają odgrywać kluczową rolę w późniejszej fazie zakażenia SARS-CoV-2, gdyż umożliwiają potwierdzenie kontaktu pacjenta z nowym koronawirusem [85].

Badania serologiczne nie powinny być stosowane natychmiast po zaobserwowaniu pierwszych objawów klinicznych choroby, ponieważ przeciwciała pojawiają się z opóźnieniem (co najmniej kilka dni od wystąpienia pierwszych objawów zakażenia). Okres, w którym pacjent jest seronegatywny pomimo zakażenia, nazywany jest oknem serologicznym. Testy serologiczne mogą uzupełniać bezpośrednie metody wykrywania wirusa SARS-CoV-2 takie jak RT-PCR, testy antygenowe.

Powszechnie dostępne są różne metody wykrywania przeciwciał, takie jak ELISA czy metoda chemiluminescencyjna CLIA (chemiluminescencyjne testy immunologiczne). Badania serologiczne, tzw. pary surowicze - czyli pobrane od tego samego pacjenta, co najmniej 2 tygodnie po sobie, mogą być stosowane do wykrywania serokonwersji lub wzrostu miana przeciwciał, zwłaszcza u pacjentów z COVID-19, u których nie wykryto materiału genetycznego/antygenowego wirusa SARS-CoV-2. Serokonwersja lub wzrost miana przeciwciał może być wykorzystywany do retrospektywnego potwierdzenia etiologii i podejmowania decyzji terapeutycznych, np. w przypadku zapalenia płuc czy burzy cytokinowej, a także do oceny immunizacji po ekspozycji na zakażenie [86, 87].

Czułość i swoistość testów serologicznych są istotnymi cechami. Przy wyborze testu serologicznego należy zwrócić uwagę na używany antygen, ponieważ to on określa czułość i swoistość testu. Wybór odpowiedniego antygeny jest kluczowy dla uzyskania wiarygodnego wyniku testu i minimalizowania ryzyka fałszywie dodatnich lub negatywnych.

Czułość testu jest ściśle związana z czasem od początku choroby, a jego przydatność wzrasta po 15 dniach od wystąpienia pierwszych objawów, zwłaszcza w wykrywaniu izolowanych przeciwciał IgG [88]. W metaanalizie Deeks i wsp., obejmującej 40 badań, oceniano obecność przeciwciał IgG przeciwko SARS-CoV-2 w pierwszym tygodniu choroby. Odsetek fałszywie ujemnych wyników wynosił od 44% do 87% [89]. Dlatego jednoczesna analiza przeciwciał IgM i IgG, ze względu na różne czasy pojawiania się przeciwciał, może zwiększyć czułość testu serologicznego [90, 91]. Rajpal i wsp. również stwierdza, że testy przeciwciał IgG i IgM oparte na ELISA mają ponad 95% swoistości dla diagnozy COVID-19

[92, 93]. Ponadto dodatkowe oznaczanie miana przeciwciał IgA jednocześnie z analizą przeciwciał IgM i IgG może również zwiększyć czułość testów serologicznych dla SARS-CoV-2, ale wykazano, że testy wykrywające tylko IgM i IgA są niewystarczające do wczesnej diagnozy COVID-19 i w związku z tym mają ograniczoną przydatność [94]. W metaanalizie opartej na wynikach z 35 badań, swoistość testów serologicznych dla wszystkich rodzajów przeciwciał ogółem wyniosła ponad 98%. Czuość testów dla wykrywanych przeciwciał klasy IgG wynosiła od 80% do 85%, z najwyższą czułością w przypadku testów CLIA, następnie ELISA i LFA [95, 96]. Ocena przeciwciał IgM wykazała czułość wynoszącą 80,9% dla CLIA, 84,5% dla ELISA i 51,4% dla LFA. To badanie pokazało również, że przy użyciu jednoczesnych testów IgM/IgG, CLIA był lepszy niż ELISA i LFA, z odpowiednio 97,3%, 90,5% i 85,8% [97].

Najnowsze dane przedstawione przez Zheng i wsp. w przeglądzie systematycznym wspierają te ustalenia, pokazując, że testy oparte na przeciwciałach IgG miały wyższą czułość niż testy oparte na przeciwciałach IgM, podczas gdy testy oparte na CLIA, z wykorzystaniem jednoczesnych testów IgG/IgM, były najbardziej dokładne diagnostycznie [98].

Wiarygodna diagnostyka serologiczna może być zapewniona poprzez użycie testów o wysokiej swoistości i wysokiej czułości, zawierających antygeny, takie jak S1 lub zmodyfikowany białko N (NCP - białko fosfoproteinowe nukleokapsydu) [99].

Emeribe i wsp. obserwowali, że odsetek pacjentów z niewykrywalnym RNA, ale z wykrywalnymi immunoglobulinami, wzrastał z 28,7% w ciągu pierwszych 3 dni do 100% w ciągu 15–39 dni po wystąpieniu objawów. Te ustalenia potwierdzają tezę, że przeciwciała mogą być traktowane, jako skuteczne narzędzia diagnostyczne uzupełniające testy oparte na RT-PCR. Ponadto, zwiększają możliwość zastosowania odpowiednich terapii i zarządzania izolacją [100].

Guo i wsp. sugerują, że kombinacja testów RNA i IgM-IgG może być bardziej czuła niż postawienie diagnozy COVID-19 opartej jedynie na RNA [101].

Fałszywie pozytywne wyniki mogą wynikać ze specyficzności, która nie osiąga 100% w żadnym z testów - tzw. reakcji krzyżowych z innymi koronawirusami lub innymi patogenami.

Reakcje krzyżowe są związane z podobieństwem antygenów między innymi koronawirusami, takimi jak HKU1, NL63, OC43 czy koronawirus 229E. Antygeny te

występują w organizmie z nadmierną odpowiedzią humoralną, np. w przebiegu chorób autoimmunologicznych (czynnik reumatoidalny) [102, 103].

Chong i wsp. przeprowadzili badanie dotyczące testów RDT opartych na przeciwciałach IgG/IgM w krajach afrykańskich, a analizowane dane wskazały, że fałszywe wyniki pozytywne są głównie związane z nieswoistą krzyżową reaktywnością krążących przeciwciał IgM w przypadku innych zakażeń wirusowych i pasożytniczych (np. metapneumowirus, wirus zapalenia wątroby typu C, ludzki wirus upośledzenia odporności, malaria). Problem ten może zostać rozwiązany poprzez jednoczesne lub sekwencyjne stosowanie dwóch testów RDT. Te ustalenia sugerują, że skuteczność zestawów testowych może się różnić w zależności od lokalizacji geograficznej próbek [104].

U nielicznych osób obserwowano brak obecności przeciwciał po zakażeniu SARS-CoV-2. Może to prowadzić do błędnej diagnozy zakażenia koronawirusem poprzez identyfikację przeciwciał we krwi pacjenta [105].

2.1 Przydatność szybkich testów immunochromatograficznych

Szybkie testy immunochromatograficzne (tzw. testy kasetkowe o charakterze jakościowym), wykrywające obecność przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2, mają ograniczoną przydatność z powodu niskiej czułości i swoistości diagnostycznej oraz wysokiego ryzyka fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich wyników [106].

2.2 Rola przeciwciał neutralizujących

Przeciwciała neutralizujące (NAbs) odgrywają kluczową rolę w eliminowaniu wirusa i uzyskiwaniu ochrony przed SARS-CoV-2. Mogą to robić na kilka sposobów, m.in. blokując wnikanie wirusa do komórek gospodarza, zakłócając wiązanie wirionu do receptorów, zapobiegając ujawnianiu genomu wirusowego w endosomach lub powodując agregację cząstek wirusowych. Ich rola w przypadku COVID-19, w tym wartość prognostyczna neutralizacji w porównaniu ze szczepieniem, pozostaje niejasna.

Badania wykazały, że większość próbek osocza ozdowieńców nie wykazuje wysokich poziomów aktywności neutralizującej. Osoby, które wyzdrowiały, posiadają rzadkie, ale powtarzające się przeciwciała anty-SARS-CoV-2 RBD (Receptor Binding Domain) o silnej aktywności przeciwwirusowej. Zestaw monoklonalnych przeciwciał (mAb)

wiązących się z RBD, pochodzący od ozdowieńców po COVID-19, obejmuje przeciwciała C121, C144 i C135, które są silnymi przeciwciałami neutralizującymi przeciwko SARS-CoV-2 [107]. Domena N-terminalna (NTD) i RBD znajdują się na białku S1. Niektóre mAb skierowane przeciwko NTD mogą hamować zakażenie SARS-CoV-2. Zapobiegają one zmianom konformacyjnym w białku S wirusa, hamując tym samym fuzję błonową i wniknięcie wirusa.

Podobnie, gdy mAb skierowane przeciwko RBD i nanociała (Nbs) skierowane i wiążące się z RBD, tworzą kompleksy RBD-mAb lub RBD-Nb, które hamują wiązanie RBD z ACE2 [108].

Test ELISA może być używany, jako proste narzędzie do oznaczenia poziomu przeciwciał neutralizujących (nAbs). Testy typu SVNT (Surrogate Virus Neutralization Test) stosowane są do oceny odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu SARS-CoV-2 lub po szczepieniu przeciwko COVID-19, umożliwiając wykrywanie przeciwciał neutralizujących [109]. Dotychczas większość dostępnych testów wykazywała wiele fałszywie dodatnich wyników w porównaniu do testów wykrywających aktywność wirusa w teście VNT. Należy zauważyć, że informacje dotyczące wykrywania przeciwciał IgG skierowanych przeciwko S1 w instrukcjach testu odnoszą się do wykrywania wszystkich przeciwciał IgG, zarówno neutralizujących, jak i nieneutralizujących.

Aby test był równoważny z testem neutralizacyjnym, powinien odwzorować naturalny proces wiązania SARS-CoV-2 z receptorem ACE2 na powierzchni komórek gospodarza, przez który wirus wchodzi do komórki. Równoważność z testem neutralizacyjnym umożliwia wykrywanie funkcjonalnych przeciwciał neutralizujących, które blokują wiązanie SARS-CoV-2 z receptorem ACE2 [110].

Pacjenci z ciężkim przebiegiem COVID-19 wytwarzają najwyższe miana przeciwciał przeciwko RBD oraz przeciwciał przeciwko białku S (Spike). Może to być związane z odpowiedzią gospodarza, która obejmuje hiperinflamację i/lub niekontrolowaną replikację wirusa, prowadzącą do nadmiernego wytwarzania przeciwciał, które działają, jako biomarkery ciężkości choroby. Pacjenci z ciężkim przebiegiem COVID-19 wykazują znaczny wzrost poziomów przeciwciał IgA i IgG skierowanych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2 w surowicy, 3-5 dni po wystąpieniu objawów choroby. Miana przeciwciał IgG skierowanych przeciwko RBD silnie korelują z mianami przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko białku S, co wskazuje, że przeciwciała skierowane przeciwko RBD mogą być

stosowane do różnicowania pacjentów z ostatnimi i wcześniejszymi zakażeniami [111]. W Tabeli 4 przedstawiono przykłady wyników testów neutralizacji pseudowirusa stosowanych do monitorowania odpowiedzi przeciwciał neutralizujących (NAbs) u pacjentów zakażonych SARS-CoV-2. Aktywność neutralizująca wykazała korelację z mianami przeciwciał przeciwko białku S (Tabela 4) [112].

Tabela 4. Przykłady wyników testów neutralizacji pseudowirusów stosowanych do monitorowania odpowiedzi przeciwciał neutralizujących (NAbs) u pacjentów zakażonych COVID-19 [113, 114, 115, 116].

| Liczba próbek | Miana przeciwciał neutralizujących (NAbs) | Czas wykrywania | Czynniki wpływające na efekt neutralizacji | Typ testu neutralizacyjnego |
|---------------|--|--|--|---|
| 149 | 33% próbek NT50 < 50, 79% próbek NT50 < 1000, średnia geometryczna NT50 = 121 (średnia arytmetyczna = 714) | Średnio 39 dni po wystąpieniu objawów. | Przeciwciała IgG skierowane przeciwko RBD i S, wiek, czas trwania i nasilenie choroby, płeć. | Test neutralizacji dla pseudowirusa HIV |
| 343 | NT50: 20- 3240 | Od wystąpienia objawów - do 75 dni po. | Miana przeciwciał IgG skierowanych przeciwko RBD (Receptor Binding Domain). | Test neutralizacji dla pseudowirusa HIV |
| 160 | Odsetek osób z ID50 \geq 100 wynosił 79%, 92% i 98% odpowiednio 13-20, 21-27 i 28-41 dni po wystąpieniu objawów. | 41 dni od wystąpienia objawów | Suchy kaszel, wysoki wskaźnik masy ciała (BMI), nadciśnienie. | Test neutralizacji dla pseudowirusa HIV |
| 14 | NAT50: 0- 2000 | Nieoszacowane | Liczba limfocytów T specyficznych dla białka nukleokapsydu | Test neutralizacji dla pseudowirusa HIV |

Opowiedź immunologiczna pozwala na budowanie odporności nabytej w trakcie życia, co w połączeniu z układem odpornościowym wrodzonym stanowi fenotyp immunologiczny osoby. Ta odpowiedź jest kluczowa w kontroli i eliminacji zakażenia przez SARS-CoV-2 [117]. W trakcie choroby tworzy się pula komórek pamięci ukierunkowanych na SARS-CoV-2, a większość komórek CD4+ kształtuje profil pamięci, co prowadzi do długotrwałej reakcji układu immunologicznego [118]. Na podstawie 44 badań dotyczących odpowiedzi serologicznej na immunizację COVID-19 wśród pracowników służby zdrowia we Włoszech, Ciniselli i wsp. doszli do wniosku, że kluczowym elementem odporności na SARS-CoV-2 są przeciwciała neutralizujące przeciwko wirusowi, wraz z produkcją komórek

B pamięci oraz komórek T pamięci CD4+ i CD8+ po zakażeniu, szczepieniu lub ponownym zakażeniu [119].

Wskazania do wykonywania testów serologicznych wykrywających przeciwciała klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 obejmują:

- Podejrzenie skąpoobjawowego lub bezobjawowego zakażenia w przypadku negatywnego wyniku testu molekularnego i wywiadu ewidentnego narażenia epidemiologicznego,

- Kontakt z pacjentem zakażonym SARS-CoV-2, ale po ustąpieniu wiremii, gdy przydatność testów RT-PCR jest ograniczona,

- U osób narażonych na SARS-CoV-2 (np. pracownicy ochrony zdrowia) - w określonych odstępach czasu w celu zaobserwowania ewentualnej serokonwersji (szczególnie istotne w aspekcie historycznym, gdy na początku pandemii zakażenie nie było tak powszechne, a szczepienia przeciwko SARS-CoV-2 nie były dostępne),

- Po przejściu infekcji grypopodobnej z powikłaniami i braku potwierdzenia diagnozy w czasie rzeczywistym za pomocą testu PCR [120],

- Po powrocie z krajów o wyższej zachorowalności na COVID-19,

- W strategii nadzoru epidemiologicznego uzupełnionego o oznaczanie miana przeciwciał, na przykład w krajach o niewystarczającym dostępie do szczepień [121, 122],

- U osób uczestniczących w badaniach epidemiologicznych w celu określenia rozpowszechnienia zakażenia w populacji, np. w badaniu przeprowadzonym przez Azami i wsp. [123],

- W celu sprawdzenia miana przeciwciał po wyzdrowieniu z naturalnej infekcji i po szczepieniu [124],

- Połączenie metod serologicznych i RT-PCR wykazuje zwiększoną czułość i swoistość [125].

2.3 Badanie odporności poszczepiennej

Liczne raporty w literaturze, prezentujące wnioski z obserwacji osób zaszczepionych preparatami przeciwko COVID-19 dostępnymi na rynku, pokazują, że szczepienie wywołuje silną odpowiedź immunologiczną humoralną, osiągając "maksimum" około 5-8 tygodni po pierwszej dawce szczepionki. W badaniu przeprowadzonym przez Assis i wsp., miano indywidualnych przeciwciał porównywano u pacjentów po szczepieniu w porównaniu do po przebytych zakażeniu naturalnym, przy użyciu serologicznej metody IFA (test immunofluorescencyjny). Uzyskane wyniki pokazały, że szczepienie mRNA indukuje znacznie wyższe poziomy przeciwciał skierowanych przeciwko RBD niż zakażenie naturalne. Miana przeciwciał neutralizujących są znacznie wyższe w odpowiedzi na szczepionkę niż w przypadku zakażenia naturalnego [126]. Udowodniono, że szczepionki mRNA są bardzo skuteczne w zwiększaniu miana przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 [127].

Zaobserwowano podwyższone miana przeciwciał u zaszczepionych osób. Stopniowo zmniejszały się one w czasie, ale pozostały podwyższone u wszystkich uczestników badania 3 miesiące po podaniu dawki przypominającej. Około 6 miesięcy po drugiej dawce szczepionki poziom przeciwciał znacząco spadał [128].

Miano przeciwciał przeciwko białku S1 podjednostki białka SARS-CoV-2 IgG (poszczepienne) było wyższe niż stężenie przeciwciał po przebytych zakażeniu. Devi i wsp. stwierdzili, że osoby seropozytywne miały istotnie wyższe poziomy przeciwciał przeciwko białku S w porównaniu do osób seronegatywnych po jednej dawce szczepionki Pfizer-BioNTech lub Moderna [129]. Ponadto, miano przeciwciał anti-S lub RBD może odzwierciedlać ochronę przed ponownym zakażeniem [130].

Warto również zauważyć, że u osób, które przyjęły trzecią dawkę szczepionki, zaobserwowano bardzo szybki wzrost poziomu przeciwciał, nawet w ciągu kilku dni.

Analiza miana przeciwciał przeciwko białku S wirusa SARS-CoV-2 w czasie zarówno u ozdowieńców, jak i u zaszczepionych pacjentów dostarcza informacji dla lepszego zrozumienia reakcji immunologicznej w przebiegu COVID-19. Prowadzenie ilościowych badań przeciwciał IgG przeciwko SARS-CoV-2 pozwala określić, czy pacjent zareagował na szczepienie i w jakim stopniu. Jest to szczególnie istotne w przypadku osób starszych i pacjentów cierpiących na choroby przewlekłe [131]. Dzięki obserwacji pacjentów

i ilościowym badaniom przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 (z wykorzystaniem antygenu S1) w klasie IgG, szansę ustalić:

- jak długo po szczepieniu utrzymują się wysokie miana przeciwciał,
- jaki poziom przeciwciał chroni przed zakażeniem lub ciężkim przebiegiem choroby,
- czy spadek poziomu przeciwciał równa się utracie odporności [132].

Ta wiedza potencjalnie pozwala podejmować uzasadnione decyzje dotyczące dawek przypominających szczepionek przeciwko COVID-19 [133, 134].

Safari i wsp. sugerują, że podjednostka Spike S1, ze szczególnym uwzględnieniem domeny RBD, jest bardzo istotna pod względem zakaźności, zdolności do transmisji oraz ucieczki przed układem odpornościowym w związku z ewolucją genomu SARS-CoV-2 i pojawianiem się kolejnych wariantów [135]. Dopico i wsp. obserwowali, że przeciwciała wywołane szczepieniem są bardziej skoncentrowane na RBD białka S niż przeciwciała wywołane zakażeniem [136]. Te wyniki wspierają hipotezę o silniejszej odpowiedzi serologicznej po szczepieniu niż w przypadku naturalnego zakażenia.

Kolejną istotną grupą są osoby posiadające tzw. hybrydową odporność, czyli osoby, które przeszły zakażenie i zostały zaszczepione przeciwko SARS-CoV-2. Misra i wsp. w swoim badaniu przeprowadzonym w Izraelu wskazują, że niezależnie od tego, jak odporność została wytworzona, ma tendencję do osłabiania się wraz z upływem czasu. Hybrydowa odporność daje niższe ryzyko zakażenia w porównaniu tylko do samego szczepienia [137].

Próg przeciwciał, który można uznać za ochronny przed zakażeniem lub ciężkim przebiegiem choroby wywołanej przez warianty SARS-CoV-2, nadal nie został jednoznacznie ustalony.

2.4 Ocena odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z immunosupresją

Pacjenci z zaburzeniami funkcjonowania układu immunologicznego (po przeszczepie, cierpiący na schyłkową niewydolność nerek, którzy są przewlekle dializowani, podczas leczenia immunosupresyjnego, chorujący na cukrzycę) są znacznie bardziej podatni na zakażenie SARS-CoV-2 oraz ciężki przebieg COVID-19. U pacjentów z immunosupresją obserwuje się niższą reakcję immunologiczną na szczepienia przeciwko COVID-19

w porównaniu do osób immunokompetentnych. Dane literaturowe wskazują, że ci pacjenci stanowią ponad 40% hospitalizacji z powodu niewystarczającej odpowiedzi na szczepienie.

Dostępne dane pokazują, że wskaźnik serokonwersji po dwóch dawkach szczepionki przeciwko COVID-19 wynosi:

- 99% dla osób bez obniżonej odporności,
- 92% dla osób z guzami litymi,
- 78% dla osób z chorobami zapalnymi związanymi z układem immunologicznym,
- 64% dla osób z nowotworami hematologicznymi,
- 27% dla biorców przeszczepów [138].

Sakuraba i wsp., opierając się na 16 badaniach obejmujących 1453 pacjentów chorujących na nowotwory, wykazali, że odsetek pacjentów osiągających odpowiedź serologiczną po jednej i dwóch dawkach szczepionki przeciwko COVID-19 wynosił odpowiednio 54,2% (95% przedział ufności [CI] 41,0–66,9) i 87,7% (95% CI 82,5–91,5). Pacjenci z nowotworami hematologicznymi mieli niższy odsetek odpowiedzi po drugiej dawce szczepionki w porównaniu do pacjentów z guzami litymi (63,7% vs. 94,9%). Może to być wynikiem niskich wskaźników odpowiedzi związanych z rodzajem schorzeń (przewlekła białaczka limfatyczna, chłoniak) oraz leczeniem (przeciwciała anti-CD20, inhibitory kinazy). Niższy odsetek pacjentów z nowotworami uzyskał odpowiedź serologiczną w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej po jednej i dwóch dawkach szczepionki (OR 0,073 [95% CI 0,026-0,20] i 0,10 [95% CI 0,039-0,26], odpowiednio) [139].

Devi i wsp. także stwierdzili, że większość pacjentów z chłoniakami nie wytwarza przeciwciał po szczepieniu (30/67), podczas gdy wszyscy zdrowi uczestnicy badania je wytworzyli. Może to być związane z powszechnie stosowanymi terapiami chłoniaków, które mogą wpływać na skuteczność szczepionek przeciwko COVID-19. Riccardi i wsp. zauważyli, że serokonwersja, po szczepieniu szczepionkami opartymi na mRNA pacjentów z chłoniakami niezróżnicowanymi oraz przewlekłą białaczką limfatyczną, osiąga 40-50%. Terapia przeciwciałami anti-CD20 i inhibitorami BTK zostały wymienione, jako powody niższej serokonwersji lub miana przeciwciał u pacjentów z chorobami hematologicznymi po szczepieniu [140].

Fox i wsp. przeprowadzili badanie dotyczące odpowiedzi serologicznej u pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2, prezentując niższe wskaźniki serokonwersji po szczepieniu przeciwko SARS-CoV-2 u pacjentów z cukrzycą w porównaniu do zdrowych osób z grupy

kontrolnej. Mimo to, odpowiedź immunologiczna pozostaje silna, co czyni ich grupą priorytetową do szczepienia [141].

Obserwowane zmniejszenie reakcji poszczepiennej u osób z immunosupresją w porównaniu do osób immunokompetentnych wydaje się być ogólnym zjawiskiem dla szczepionek przeciwko COVID-19, bez względu na technologię produkcji szczepionki [142].

U pacjentów z immunosupresją, którzy otrzymali dodatkową dawkę szczepionki 1-3 miesiące po podstawowym schemacie szczepień, zaobserwowano następujące zjawiska:

- Reakcje poszczepienne zbliżone w porównaniu do tych po podaniu podstawowych dawek (brak obaw dotyczących bezpieczeństwa),
- Wzrost odpowiedzi humoralnej z 41% do 67% w porównaniu do poziomu po pierwotnym szczepieniu,
- Produkcję przeciwciał u osób, które nie wykazywały tej odpowiedzi immunologicznej po podstawowym szczepieniu (średnio 44%) [143].

Wyniki sugerują, że pacjenci z immunosupresją powinni kontynuować stosowanie środków bezpieczeństwa, w tym noszenie maseczek ochronnych po szczepieniu. Cortés-Sarabia i wsp., analizując zmiany w odpowiedzi immunologicznej humoralnej wywołane podaniem szczepionki Pfizer/BioNTech BNT162b2, doszli do wniosku, że ocena fluktuacji odpowiedzi immunologicznej przeciwko białku S po szczepieniu jest istotna głównie w populacji osób z immunosupresją [144].

Dlatego też oznaczanie miana przeciwciał może pomóc w identyfikacji potrzeby dodatkowych dawek przypominających szczepionek lub niskiej odpowiedzi immunologicznej u osób z immunosupresją, które mogą skorzystać z profilaktycznych lub terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku S [145].

Coraz więcej wiadomo na temat reakcji immunologicznej po przechorowaniu COVID-19. Ocena odpowiedzi humoralnej może wskazywać na wcześniejszy kontakt z wirusem, także u osób, które przebyły chorobę bezobjawowo. Niemożliwe jest postawienie diagnozy wyłącznie na podstawie badań serologicznych, choć rola informacyjna przeciwciał jest bardzo istotna.

Obecnie nie jest znane miano przeciwciał zapewniających ochronę. Jednakże zauważono, że po zakażeniu miano przeciwciał jest zazwyczaj niższe, a przeciwciała znikają szybciej niż po szczepieniu - dlatego zaleca się szczepienie również u ozdowieńców. Testy

serologiczne są użyteczne w medycynie populacyjnej, a zwłaszcza w przypadku pacjentów w zależności od sytuacji klinicznej.

Możliwe jest obserwowanie zmian w mianie przeciwciał neutralizujących w czasie poprzez powtarzanie ilościowych testów przeciwciał w przyszłości. Jeśli zmiany w mianie przeciwciał są monitorowane w czasie, test powinien być przeprowadzany tym samym testem i w tym samym laboratorium.

Monitorowanie miana przeciwciał w czasie pozwala na obserwację dynamiki miana w zależności od wielu czynników takich jak ciężkość przebiegu choroby, nasilenie stanu zapalnego, wywiadu szczepień u chorych hospitalizowanych. U osób z populacji ogólnej badanie miana przeciwciał pozwala natomiast na wykrywanie osób, które chorobę przeszły bezobjawowo oraz porównać różnice w wytwarzaniu przeciwciał w stosunku do pacjentów którzy chorobę przeżyli z dużym nasileniem i koniecznością hospitalizacji, co może mieć ważne znaczenie z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Z tych przesłanek wynikały cele przeprowadzonej pracy.

3. Cele pracy:

Praca badawcza przebiegała w dwóch etapach, co wynikało ze zmieniającej się sytuacji pandemicznej i nowych potrzeb adekwatnych do dynamicznego rozwoju sytuacji epidemiologicznej oraz ewolucji zrozumienia choroby i jej skutków.

3.1 Etap I

Celem prac przeprowadzonych w Etapie I było ocenienie obecności przeciwciał anty-S przeciwko SARS-CoV-2 u ozdrowieńców po COVID-19.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Ocenę dynamiki miana przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w czasie
- Ocenę różnic w wytwarzaniu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w zależności od nasilenia choroby
- Ocenę różnic w wytwarzaniu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w zależności od statusu szczepienia

- Ocenę korelacji między wytwarzeniem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 a parametrami zapalnymi

3.2 Etap II

Celem II etapu badań serologicznych realizowanych w trakcie pandemii, była ocena obecności przeciwciał anti-S i anti-N przeciwko SARS-CoV-2 6 miesięcy po zakażeniu COVID-19 we wszystkich falach pandemii oraz porównanie odpowiedzi immunologicznej u pacjentów i w zdrowej populacji.

Cele szczegółowe były następujące:

- Ocena częstości występowania przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w populacji ogólnej podczas czterech fal pandemii

- Ocena różnic w wytwarzaniu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 między ozdowieńcami a zdrową populacją

- Ocena częstości zakażeń bezobjawowych w oparciu o status przeciwciał anti-N

- Ocena różnic w wytwarzaniu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w oparciu o status szczepienia

- Ocena różnic w wytwarzaniu przeciwciał w zależności od objawów w ostrej fazie choroby i 6 miesięcy po przechorowaniu.

4. Materiał i metody:

4.1 Etap I

Do badania włączono 322 pacjentów (282 hospitalizowanych i 40 pacjentów z łagodnymi objawami COVID-19 izolowanych w domu) w wieku średnim $59,1 \pm 15,72$ lat, obojga płci (165 kobiet i 157 mężczyzn) z przebyłym zakażeniem SARS-CoV-2.

Diagnoza zakażenia wirusem SARS-CoV-2 została potwierdzona testem PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) za pomocą systemu CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) używając materiału pobranego wymazami z nosogardzieli lub gardła. Pacjenci nie zgłaszali w wywiadzie wcześniejszego zakażenia SARS-CoV-2.

Krew pobierano w 4 punktach czasowych od 29.02.2020 do 21.05.2021r.: podczas hospitalizacji (próbka I), po 1 miesiącu (próbka II), po 3 miesiącach (próbka III) oraz po 6 miesiącach (próbka IV) od hospitalizacji. Obliczono współczynniki miana przeciwciał oznaczanych w poszczególnych punktach czasowych: II/I, III/I, IV/I, III/II, IV/II, IV/III. Dziewięćdziesięciu trzech pacjentów przyjęło szczepionki przeciwko COVID-19 między pobraniem III a IV próbki. W przypadku pacjentów z łagodnymi objawami zakażenia pobrano tylko próbki na badania serologiczne. W związku z izolacją w domu nie przeprowadzono badań laboratoryjnych ani radiologicznych.

Wykrywanie przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w klasie IgG przeprowadzono testem ilościowym LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (DiaSorin, Włochy). Ocenę przeprowadzono za pomocą w pełni zautomatyzowanego rozwiązania na platformie LIAISON XL, zgodnie z zaleceniami producenta.

Analizowano objawy kliniczne i parametry laboratoryjne takie jak WBC, neutrofile, limfocyty, trombocyty, D-dimery oraz CRP. Parametry laboratoryjne, zostały oznaczone przed i po leczeniu. W wywiadzie uwzględniono pytanie o przebycie szczepień (typ szczepionki, liczba dawek, czas szczepienia).

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr APK.002.259.2020). Wszyscy pacjenci podpisali zgodę na udział w badaniu.

4.2 Etap II

W drugim etapie populacja badanych osób składała się z 2 grup:

Grupa I - osoby po przebyciu COVID-19 - 232 pacjentów, którzy wymagali hospitalizacji. Pacjenci byli oceniani sześć miesięcy po zakażeniu. Pacjenci cierpieli na choroby przewlekłe: 99 (42,7%) na nadciśnienie tętnicze, 3 (1,3%) na niewydolność serca, 19 (8,2%) na cukrzycę, 102 (44%) na otyłość, 17 (7,3%) na niewydolność nerek, 24 (10,3%) z chorobą nowotworową, 8 (3,4%) na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, 17 (7,3%) na astmę.

Grupa II - 544 pacjentów z kohorty badania populacyjnego - Białystok PLUS. Badanie Białystok PLUS dostarcza informacji na temat stanu zdrowia lokalnej społeczności poprzez analizę badań i ankiet przeprowadzonych na starannie wybranej kohorcie reprezentatywnej

dla populacji lokalnej. Badanie Białystok PLUS dotyczy aktualnego stanu zdrowia populacji, dostarczając cennych informacji zarówno o rozwoju chorób, jak i o tle psychologicznym i socjologicznym, które mogą na nie wpływać. W ramach projektu Białystok PLUS uczestniczyć mogą jedynie osoby wybrane losowo spośród populacji Białegostoku i zaproszone indywidualnie do udziału. Niestety, nie ma możliwości akceptacji czyjegoś innego niż wylosowane zaproszenia do udziału w badaniu. Aby osiągnąć wiarygodne rezultaty, istotne jest, aby w projekcie uczestniczyły dokładnie te osoby, które zostały wylosowane. Nie można w żaden sposób uwzględnić wyników osób, które zgłaszają się dobrowolnie [146].

U pacjentów stwierdzano następujące choroby współistniejące: 157 (28,9%) na nadciśnienie tętnicze, 12 (2,2%) na niewydolność serca, 39 (7,2%) na cukrzycę, 133 (24,5%) na otyłość, 30 (5,5%) na niewydolność nerek, 31 (5,7%) z chorobą nowotworową, 14 (2,6%) na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, 26 (4,8%) na astmę.

Ta grupa została podzielona na 2 podgrupy:

Grupa IIa (pacjenci z populacji, którzy mieli COVID-19 - 151 pacjentów)

Grupa IIb (pacjenci z populacji, którzy zgłosili, że nie mieli COVID-19 - 393 pacjentów).

Powyższe grupy badawcze składały się z osób wybranych z lokalnej populacji.

Miano przeciwciał anti-N i anti-S były oceniane sześć miesięcy po przebytych zakażeniu dla każdego pacjenta we wszystkich falach pandemii:

Fala 1 - od 29.02.2020 do 31.12.2020r. - warianty "dzikie"

Fala 2 od 01.01.2021 do końca kwietnia 2021 r. - warianty "dzikie" i Alfa

Fala 3 od 01.05.2021 do 31.12.2021r. - Warianty Delta

Fala 4 od 01.01.2022 do 31.03.2022r. - Warianty Omikron [147].

Charakterystykę demograficzną i status szczepień pacjentów z badanych grup przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka demograficzna i status szczepień ogółem oraz w poszczególnych falach pandemii.

| | Grupa I | | | Grupa II | | |
|--------------------|---|---|--------|---|---|--------|
| | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max |
| Wiek (lata) | | | | | | |
| Ogółem | 54 | 23 | 78 | 50 | 20 | 80 |
| Fala 1 | 54 | 27 | 78 | 40,5 | 29 | 66 |
| Fala 2 | 57 | 34 | 78 | 51 | 21 | 79 |
| Fala 3 | 54 | 23 | 76 | 50 | 20 | 80 |
| Fala 4 | 49 | 36 | 73 | 51 | 20 | 79 |
| Szczepienie | | | | | | |
| | Liczba i % zaszczepionych pacjentów | Liczba i % Pacjentów o nieznanym statusie szczepienia | Ogółem | Liczba i % zaszczepionych pacjentów | Liczba i % Pacjentów o nieznanym statusie szczepienia | Ogółem |
| Ogółem | 113 (48,7%) | 119 (51,3%) | 232 | 319 (58,7%) | 224 (41,3%) | 543 |
| Fala 1 | 50 (48,1%) | 54 (51,9%) | 104 | 0 (0%) | 10 (100%) | 10 |
| Fala 2 | 19 (73,1%) | 7 (26,9%) | 26 | 11 (11,6%) | 84 (88,4%) | 95 |
| Fala 3 | 37 (40,7%) | 54 (59,3%) | 91 | 86 (65,6%) | 45 (34,4%) | 131 |
| Fala 4 | 7 (63,6%) | 4 (36,4%) | 11 | 222 (72,3) | 85 (37,7%) | 307 |
| Płeć | | | | | | |
| | Liczba i % mężczyzn | Liczba i % kobiet | Ogółem | Liczba i % mężczyzn | Liczba i % kobiet | Ogółem |
| Ogółem | 117 (50,4%) | 115 (49,6%) | 232 | 250 (46%) | 293 (54%) | 543 |
| Fala 1 | 49 (47,1%) | 55 (52,9%) | 104 | 4 (40%) | 6 (60%) | 10 |
| Fala 2 | 13 (50%) | 13 (50%) | 26 | 56 (58,9%) | 39 (41,1%) | 95 |
| Fala 3 | 51 (56%) | 40 (44%) | 91 | 63 (48,1%) | 69 (51,9%) | 131 |
| Fala 4 | 4 (36,4%) | 7 (63,6%) | 11 | 127 (41,4%) | 180 (58,6%) | 307 |

Wykrywanie przeciwciał anti-S w klasie IgG zostało przeprowadzone za pomocą testów LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (DiaSorin, Włochy). Ocena została przeprowadzona za pomocą w pełni zautomatyzowanego procesu na LIAISON XL. Wyniki były podawane w jednostkach AU/ml. Próg odcięcia był wyznaczony, jako >15,0 AU/ml.

Wykrywanie przeciwciał anti-N w klasie IgG zostało przeprowadzone za pomocą Elecsys Anti-SARS-CoV-2 - testu immunologicznego przeznaczonego do jakościowego wykrywania przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w surowicy i osoczu ludzkim. Ocena została przeprowadzona za pomocą w pełni zautomatyzowanego procesu COBAS. Wynik

badanej próbki był podawany, jako reaktywny lub niereaktywny, a także w postaci wskaźnika odcięcia (COI; próbka sygnałowa/odcięcie), zgodnie z zaleceniami producenta.

Wśród pacjentów, u których wykonano oznaczenia, przeprowadzono ankietę dotyczącą statusu szczepień i stanu zdrowia.

Na przeprowadzenie badania została udzielona zgoda przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska (numer zatwierdzenia: APK.002.346.2020). Wszystkie procedury przeprowadzone w badaniach były zgodne z Deklaracją Helsińską. Pacjenci brali udział w badaniu dobrowolnie i wyrazili pisemną zgodę na udział. Wszystkie procedury zostały dokładnie wyjaśnione uczestnikom przed rozpoczęciem badania. Nie było kryteriów wyłączenia.

5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.0. Dane zostały przedstawione, jako średnie i odchylenia standardowe lub mediany, minimum i maksimum, w zależności od rozkładu.

Rozkład normalny został oceniony testem Shapiro-Wilka. W analizie statystycznej użyto testu U Manna-Whitneya, testu parowanego Wilcoxon'a oraz testów Kruskala-Wallis'a i chi-kwadrat. Korelacje zostały zmierzone za pomocą testu rang Spearmana. Poziom prawdopodobieństwa $P < 0,05$ uznano za istotny statystycznie.

6. Wyniki:

6.1 Ogólne wyniki etapu I

Parametry laboratoryjne i miana przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 wszystkich pacjentów włączonych do badania podczas przyjęcia przedstawiono w Tabeli 6 i 7.

Tabela 6. Parametry laboratoryjne wszystkich pacjentów włączonych do badania podczas hospitalizacji.

| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max |
|------------------------------|---------|-------|---------|-------|--------|
| Wiek | 59,1 | 15,7 | 60 | 19 | 94 |
| Badania laboratoryjne | | | | | |
| CRP (mg/l) | 73 | 70,1 | 50 | 0,3 | 328,4 |
| Prokalcytonina (ng/ml) | 0,2 | 0,6 | 0,1 | 0,01 | 6,6 |
| WBC (1/ μ l) | 6362 | 3553 | 5630 | 1400 | 40570 |
| PLT (1/ μ l) | 205843 | 89702 | 191000 | 42000 | 933000 |
| IL-6 (pg/ml) | 69,4 | 97,6 | 43,5 | 1,5 | 1170,5 |
| D-dimery (ng/ml) | 2540 | 10473 | 820 | 106 | 102965 |
| ALT (IU/l) | 41,3 | 36 | 30 | 5 | 305 |

Tabela 7. Miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 pacjentów hospitalizowanych.

| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max |
|-------------------------------------|---------|-------|---------|-----|-------|
| Wiek | 59,1 | 15,7 | 60 | 19 | 94 |
| Badania serologiczne | | | | | |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 I | 78,4 | 83,4 | 63,4 | 1,0 | 535 |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 II | 174,8 | 192,3 | 126 | 1,0 | 1460 |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 III | 289,3 | 655,6 | 130,5 | 1,0 | 4970 |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 IV | 1828 | 4096 | 390 | 0,0 | 20000 |
| Współczynnik II/I | 18,5 | 48,1 | 1,9 | 0,0 | 277 |
| Współczynnik III/I | 20,6 | 69,5 | 1,6 | 0,0 | 400 |
| Współczynnik IV/I | 13,2 | 28,8 | 1,0 | 0,0 | 128,2 |

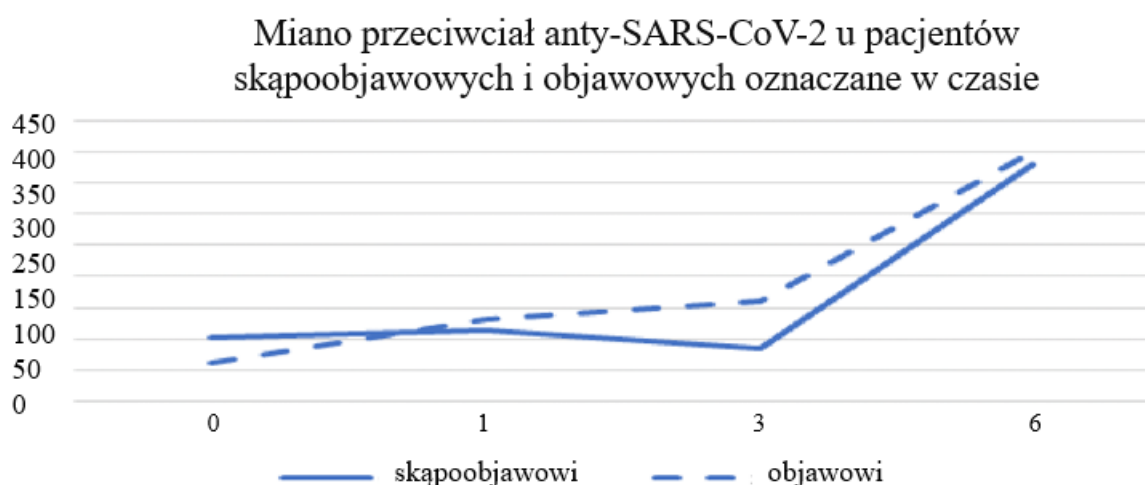
6.1.1 Etap I

Analiza podgrup z podziałem na płeć wykazała różnice jedynie w wynikach badań laboratoryjnych, a nie w serologicznych. Analiza wyników testów serologicznych wykazała istotne różnice w współczynnikach pobrania IV/I oraz znaczący wzrost miana przeciwciał po szczepieniu. Największy wzrost zaobserwowano między 3 a 6 miesiącem, gdy pacjenci byli już po szczepieniu. Odpowiedź immunologiczna po przechorowaniu COVID-19 utrzymywała się przez ponad 6 miesięcy u wszystkich pacjentów, choć miana przeciwciał były znacząco wyższe u pacjentów z historią ciężkiego przebiegu COVID-19 oraz u zaszczepionych pacjentów.

Odpowiedź immunologiczna po przechorowaniu COVID-19 nie zależała od płci. Zaobserwowano istotną korelację między wytwarzaniem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 a stopniem stanu zapalnego w ostrej fazie choroby (parametry zapalne we krwi i rozległość zmian w płucach uwidocznionych badaniem TK klatki piersiowej).

Porównanie wyników testów serologicznych w zależności od przebiegu choroby przedstawiono w Tabeli 8 i na Rycinie 3. Przebieg skąpoobjawowy określany był kiedy u pacjentów występowały dwa objawy choroby lub mniej. Natomiast przebieg określano jako objawowy, gdy występowały dwa objawy lub więcej.

Rycina 3. Miano przeciwciał IgG anty-SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 o przebiegu skąpoobjawowym w porównaniu z objawowym.



Analiza wyników testów serologicznych, w zależności od przebiegu choroby, wykazała istotne różnice między wyższym mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 u pacjentów z objawami 3 miesiące po zakażeniu oraz istotnie wyższym współczynnikiem pobrania II/I.

Tabela 8. Wyniki badań serologicznych pacjentów w zależności od przebiegu choroby.

| | Przebieg objawowy n=282 | | | | | Przebieg skąpoobjawowy n=40 | | | | | P |
|--|-------------------------|-------|---------|------|-------|-----------------------------|-------|---------|-----|-------|------|
| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | |
| Wiek | 59,4 | 16 | 60 | 19 | 94 | 55,8 | 13,2 | 57,5 | 38 | 81 | NS |
| Badania serologiczne | | | | | | | | | | | |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 I | 70,1 | 63,2 | 60,4 | 1,0 | 307 | 121,4 | 139,9 | 101,3 | 1,0 | 535 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 II | 182,3 | 203,9 | 131,0 | 1,0 | 1460 | 157 | 157,5 | 114 | 1,0 | 712 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 III | 365 | 767,9 | 162,0 | 1,0 | 4970 | 115 | 117,8 | 83,5 | 1,0 | 400 | 0,0 |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 IV | 1785 | 3893 | 400 | 36,5 | 20000 | 2034 | 4718 | 380 | 0,0 | 18500 | NS |
| Współczynnik II/I | 22,1 | 52,6 | 2,0 | 0,0 | 277 | 3 | 5,8 | 1,3 | 0,0 | 24,5 | 0,03 |
| Współczynnik III/I | 23,2 | 74,9 | 1,7 | 0,0 | 400 | 5,6 | 12,2 | 1,6 | 0,0 | 38 | NS |
| Współczynnik III/II | 8 | 42,4 | 0,8 | 0,0 | 337 | 1,1 | 0,7 | 1 | 0,1 | 3,6 | NS |
| Współczynnik IV/I | 12,8 | 29,1 | 1 | 0,0 | 128,2 | 21,4 | 28,9 | 21,4 | 1,0 | 41,8 | NS |
| Współczynnik IV/II | 192,8 | 977,5 | 2,0 | 0,2 | 5180 | 20,5 | 34,3 | 6,5 | 0,0 | 92,7 | NS |
| Współczynnik IV/III | 6,4 | 11,3 | 1,6 | 0,3 | 50 | 11,8 | 25,6 | 1,7 | 0,6 | 79,1 | NS |

Porównanie wyników badań serologicznych i biochemicznych w zależności od płci przedstawiono w Tabeli 9 i 10, wykazując różnice jedynie w testach laboratoryjnych, ale nie w wynikach testów serologicznych (Tabela 9, Tabela 10, Rycina 4).

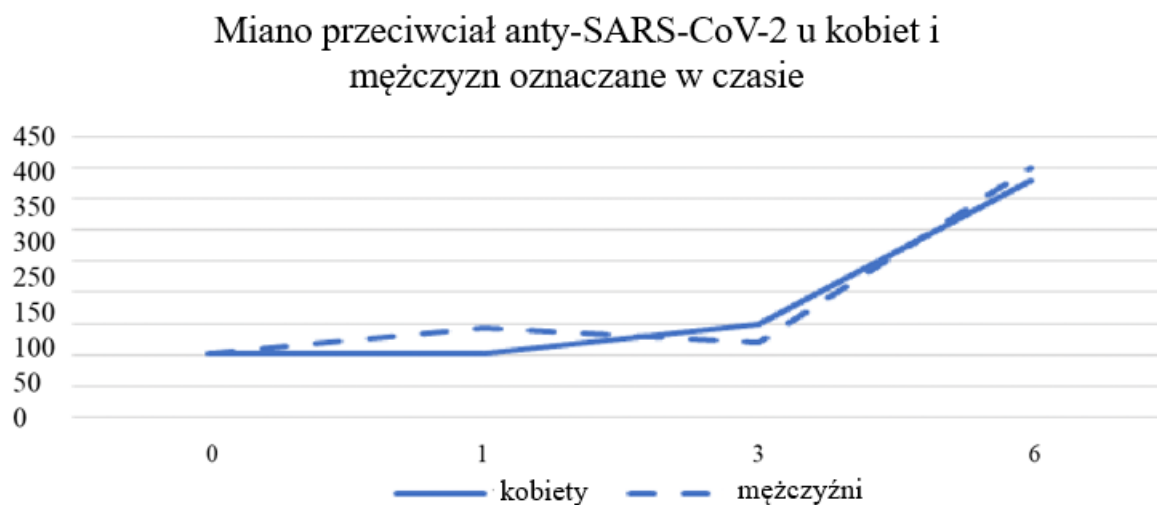
Tabela 9. Wyniki badań biochemicznych pacjentów w zależności od płci.

| | Kobiety n=165 | | | | | Mężczyźni n=157 | | | | | P |
|-------------------------------|---------------|--------|---------|-------|--------|-----------------|--------|---------|-------|--------|------|
| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | |
| Wiek | 61,4 | 15,9 | 62 | 19 | 94 | 56,6 | 15,1 | 56 | 22 | 92 | 0,05 |
| Badania biochemiczne | | | | | | | | | | | |
| CRP (mg/l) | 62,6 | 68,1 | 35,3 | 0,3 | 321,5 | 83,8 | 70,8 | 60,8 | 0,65 | 328,4 | 0,05 |
| Prokalcytonina (ng/ml) | 0,2 | 0,6 | 0,1 | 0,03 | 4,2 | 0,2 | 0,7 | 0,1 | 0,01 | 6,6 | 0,05 |
| WBC (1/μl) | 5891,3 | 2791,5 | 5080 | 1400 | 17360 | 6850,2 | 4153,2 | 6110 | 2470 | 40570 | 0,05 |
| PLT (1/μl) | 203154 | 74098 | 190000 | 42000 | 463000 | 208630 | 103628 | 191000 | 43000 | 933000 | NS |
| IL-6 (pg/ml) | 58,2 | 60 | 38,3 | 1,5 | 303,5 | 80 | 122,6 | 50 | 1,5 | 1170,5 | NS |
| D-dimery (ng/ml) | 2385,4 | 9695,1 | 812 | 106 | 93239 | 2699,9 | 11258 | 845,5 | 138 | 102965 | NS |
| ALT (IU/l) | 37,9 | 41,7 | 25 | 7 | 305 | 44,8 | 28,7 | 37 | 5 | 142 | 0,05 |

Tabela 10. Wyniki badań serologicznych pacjentów w zależności od płci.

| | Kobiety n=165 | | | | | Mężczyźni n=157 | | | | | P |
|---|---------------|-------|---------|------|-------|-----------------|------|---------|------|-------|------|
| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | |
| Wiek | 61,4 | 15,9 | 62 | 19 | 94 | 56,6 | 15,1 | 56 | 22 | 92 | 0,05 |
| Badania serologiczne | | | | | | | | | | | |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 I | 104,9 | 89,6 | 101 | 13,1 | 535 | 97,1 | 54,7 | 101 | 13,5 | 307 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 II | 196,4 | 238,9 | 101 | 21,5 | 1460 | 171,5 | 123 | 142,5 | 10 | 580 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 III | 258,9 | 417 | 150 | 16,8 | 2880 | 339,8 | 836 | 121 | 29,1 | 4970 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 IV | 2279 | 5104 | 380 | 16 | 20000 | 1257,1 | 1924 | 400 | 46,4 | 7590 | NS |
| Współczynnik II/I | 3 | 3,1 | 1,9 | 0,3 | 12,1 | 2,2 | 1,6 | 1,5 | 0,2 | 6,7 | NS |
| Współczynnik III/I | 3,9 | 3,3 | 2,4 | 1 | 12,9 | 7,9 | 24,9 | 2 | 0,8 | 113,2 | NS |
| Współczynnik IV/I | 30,7 | 40,7 | 8,3 | 0,6 | 128,2 | 18,9 | 30,6 | 3,3 | 1,2 | 85,2 | NS |

Rycina 4. Miano przeciwciał IgG anti-SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 w zależności od płci.



6.1.2 Porównanie wyników badań serologicznych w zależności od wywiadu szczepień

Porównanie wyników badań serologicznych i biochemicznych w zależności od wywiadu szczepień przedstawiono w Tabeli 9 i 10. Wszyscy pacjenci, którzy zostali zaszczepieni, otrzymali szczepionkę między pobraniem trzeciej a czwartej próbki. Mediana czasu między szczepieniem a badaniem wynosiła 28 dni.

Analiza wyników testów serologicznych podczas podziału grup według wywiadu szczepień wykazała istotne różnice w punkcie czasowym IV w porównaniu do punktu pobrania I (współczynnik). Dokonano szczepień u dziewięćdziesięciu trzech pacjentów, a analiza miana przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 za pomocą testu Wilcoxa wykazała istotny wzrost poziomu przeciwciał w tej podgrupie (Rycina 5). Największy wzrost zaobserwowano między trzecim a szóstym miesiącem (próbki III i IV), gdy większość osób została zaszczepiona. Trend wzrostowy w wytwarzaniu przeciwciał między trzecim a szóstym miesiącem odzwierciedlono również w grupie nieszczepionych, chociaż wzrost był niewielki.

Rycina 5. Miano przeciwciał IgG przeciwko SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 wśród pacjentów zaszczepionych i niezaszczepionych przeciwko SARS-CoV-2.

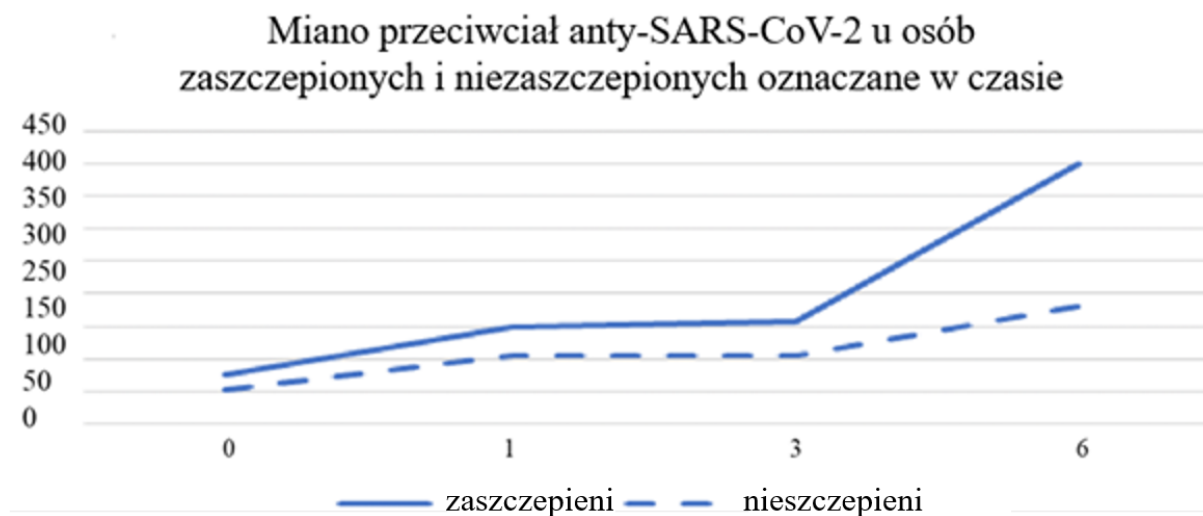


Tabela 11. Wyniki badań biochemicznych w zależności od wywiadu szczepień.

| | Pacjenci zaszczepieni n=93 | | | | | Pacjenci niezaszczepieni n=229 | | | | | P |
|----------------------------------|----------------------------|--------|---------|-------|--------|--------------------------------|--------|---------|-------|--------|----|
| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | |
| Wiek | 58,1 | 12,4 | 60,5 | 27 | 84 | 59,5 | 16,9 | 60 | 19 | 94 | NS |
| Badania biochemiczne | | | | | | | | | | | |
| CRP (mg/l) | 68,1 | 73,7 | 40,6 | 0,5 | 287,4 | 74,6 | 69,1 | 51,4 | 0,3 | 328,4 | NS |
| Prokalcytonina (ng/ml) | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 2,8 | 0,2 | 0,7 | 0,1 | 0,01 | 6,6 | NS |
| WBC (1/μl) | 6133,1 | 2391,9 | 5370 | 2550 | 13250 | 6434 | 3846,9 | 5670 | 1400 | 40570 | NS |
| PLT (1/μl) | 212373 | 93297 | 197000 | 42000 | 480000 | 203799 | 88672 | 187000 | 43000 | 933000 | NS |
| IL-6 (pg/ml) | 60,7 | 61,9 | 32,5 | 2,9 | 267,1 | 71,4 | 104,2 | 45,4 | 1,5 | 1170,5 | NS |
| D-dimery (ng/ml) | 1959,6 | 7796 | 747 | 106 | 63564 | 2721,1 | 11190 | 823 | 138 | 102965 | NS |
| ALT (IU/l) | 43 | 35,7 | 34 | 11 | 241 | 40,7 | 36,2 | 30 | 5 | 305 | NS |

Tabela 12. Wyniki badań serologicznych w zależności od wywiadu szczepień

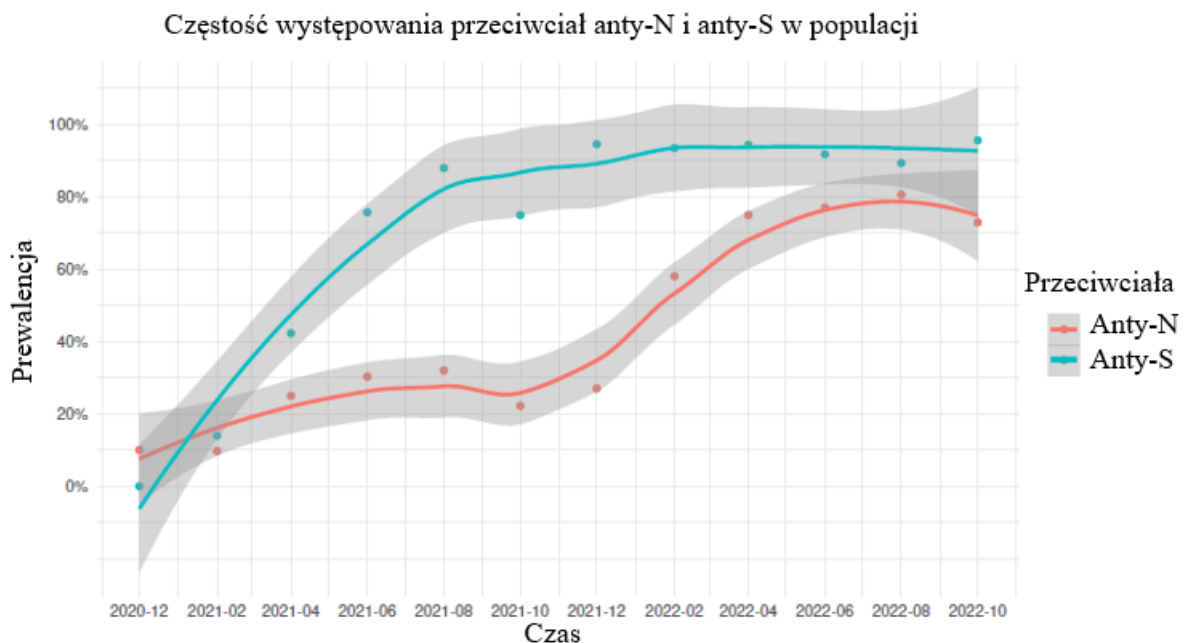
| | Pacjenci zaszczepieni n=93 | | | | | Pacjenci nieszczepieni n=229 | | | | | P |
|---|----------------------------|--------|---------|------|-------|------------------------------|--------|---------|------|------|------|
| | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | Średnia | SD | Mediana | Min | Max | |
| Wiek | 58,1 | 12,4 | 60,5 | 27 | 84 | 59,5 | 16,9 | 60 | 19 | 94 | NS |
| Badania serologiczne | | | | | | | | | | | |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 I | 87,4 | 96,2 | 75,5 | 1,0 | 535 | 67,7 | 61,1 | 54 | 1,0 | 207 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 II | 193,7 | 211,7 | 149,5 | 1,0 | 1460 | 146,3 | 154,2 | 106,5 | 1,0 | 726 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 III | 366,4 | 803 | 157 | 1,0 | 4970 | 158 | 170 | 105 | 1,0 | 706 | NS |
| Przeciwciała anty-SARS- CoV-2 IV | 2223,8 | 4598,7 | 400 | 1,0 | 20000 | 621,5 | 1191,3 | 181,5 | 19,8 | 3910 | NS |
| Współczynnik II/I | 19,6 | 55,2 | 1,7 | 1000 | 277 | 16,9 | 35,6 | 1,9 | 0,15 | 168 | NS |
| Współczynnik III/I | 28,6 | 84,4 | 2 | 0,0 | 400 | 5,3 | 15,5 | 1,1 | 0,0 | 71,7 | NS |
| Współczynnik IV/I | 17,2 | 33,8 | 1,3 | 0,0 | 128,2 | 5,5 | 12,9 | 0,8 | 0,0 | 41,8 | 0,04 |

Przeprowadzono analizę korelacji między mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 a wybranymi parametrami laboratoryjnymi i radiologicznymi. Procent zajętych przez COVID-19 płuc uwidocznionych badaniem TK klatki piersiowej korelował z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,3$, $P < 0,05$). Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) przed leczeniem korelowało z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2I ($R = 0,22$, $P < 0,05$), przeciwciałami przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,37$, $P < 0,05$) i przeciwciałami przeciwko SARS-CoV-2 III ($R = 0,39$, $P < 0,05$). Stężenie prokalcytoniny korelowało z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,22$, $P < 0,05$). Wartość IL-6 przed leczeniem korelowała z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,25$). Wartości D-dimerów przed leczeniem korelowały z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,41$) i mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 III ($R = 0,25$). Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) przed leczeniem korelowała z mianem przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 II ($R = 0,39$).

6.2 Etap II

Częstość wykrywania przeciwciał klasy IgG anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu dla każdego pacjenta we wszystkich falach pandemii przedstawiono na Rycinie 6. Obserwowano stopniowy wzrost częstości występowania obu analizowanych przeciwciał, pokazując 92,5% przeciwciał anty-S i 69,7% przeciwciał anty-N po fali Omikron (Rycina 6).

Rycina 6. Występowanie przeciwciał anty-N i anty-S w populacji we wszystkich falach pandemii COVID-19.



Szczegółowa analiza pokazała, że 17,4% całkowitej badanej populacji miało stwierdzone dodatnie miano przeciwciał anty-N, pomimo braku zgłoszenia przebytego COVID-19 (prawdopodobnie bezobjawowy przebieg COVID-19), a 9% badanych miało przeciwciała anty-S pomimo braku wywiadu szczepienia czy przebycia COVID-19. Niemniej jednak rzeczywiste liczby są bliższe wartościom mierzonym w ostatnich miesiącach badania, co szczególnie podkreśla wysoką częstość występowania bezobjawowego COVID-19.

Spośród hospitalizowanej populacji 6 miesięcy po czwartej fali pandemii, odpowiednio 4,3% i 3,7% nie wykazywało znaczącego statystycznie wzrostu miana przeciwciał anty-S i anty-N. Jedynie 1% pacjentów zaszczepionych nie wytworzył przeciwciał anty-S. Porównanie mediany wieku osób, które nie odpowiedziały na szczepienie, wskazywało na starszy wiek (42,4 vs 65,4, $p < 0,05$).

W analizie częstości zakażeń wirusem SARS-CoV-2 w porównaniu z liczbą zachorowań w każdej fali pandemii, 93,4% stanowiło grupę hospitalizowaną, 4,9% stanowiło grupę IIa, a 1,7% stanowiło grupę IIb ($p < 0,05$).

Osoby zaszczepione biorące udział w badaniu były starsze niż te, które nie były zaszczepione (mediana wieku zaszczepionych pacjentów wynosiła 55 lat (zakres 20-80); podczas gdy mediana wieku nieszczepionych wynosiła 45 lat (zakres 20-78), $p < 0,05$). Wśród pacjentów, którzy nie mieli wywiadu potwierdzonej choroby COVID-19, grupa z dodatnią wartością miana przeciwciał anti-S była istotnie starsza. Płeć nie miała wpływu na różnice w występowaniu przeciwciał anti-N i anti-S po wszystkich analizowanych falach pandemii. Porównanie miana przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu we wszystkich grupach wykazało wyższe miano przeciwciał anti-N (mediana - 97,34; min - 0,078; max - 275,3) u pacjentów, którzy chorowali na COVID-19, w porównaniu z populacją (mediana - 0,091; min - 0,05; max - 293,3), $p < 0,05$, co jest zgodne z wiedzą na temat immunogenności wirusa SARS-CoV-2. Miano przeciwciał anti-S 6 miesięcy po zakażeniu nie wykazało różnic istotnych statystycznie między Grupą I (mediana - 1190 BAU/ml; min - 16,3 BAU/ml; max - 98900 BAU/ml) a Grupą II (mediana - 1090 BAU/ml; min - 4,81 BAU/ml; max - 53936 BAU/ml).

Porównanie miana przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu między pacjentami z objawowym przebiegiem choroby, wymagającymi hospitalizacji a populacją, która nie wymagała hospitalizacji, ale chorowała na COVID-19, wykazało wyższe miano przeciwciał anti-N u pacjentów hospitalizowanych (Tabela 13). Analizę różnic w mianie przeciwciał anti-N i anti-S między pacjentami, którzy zgłaszali różne objawy w ostrej fazie infekcji (np. gorączka, suchy lub mokry kaszel, duszność, spadek saturacji tlenu, zmęczenie, katar, ból mięśni, ból w klatce piersiowej, anosmia, ból głowy, dreszcze), a 6 miesięcy po zakażeniu (np. duszność, suchy lub mokry kaszel, zaburzenia pamięci i koncentracji, bóle głowy, zaburzenia ciśnienia krwi, zaburzenia rytmu serca) przedstawiono w Tabeli 14 i Tabeli 15.

Tabela 13. Porównanie miana przeciwciał anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu między pacjentami wymagającymi hospitalizacji a populacją, która nie wymagała hospitalizacji, ale chorowała na COVID-19.

| | Grupa I | | | Grupa IIa | | | P |
|---------------|---------|------|-------|-----------|------|-------|---------|
| | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max | |
| Anty-N | 97,3 | 0,08 | 275,3 | 41,5 | 0,06 | 259 | 0,00025 |
| Anty-S | 1190 | 16,3 | 98900 | 1290 | 4,8 | 39500 | NS |

Tabela 14. Miano przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu u pacjentów pod względem objawów w ostrej fazie choroby.

| Objawy | | Obecne | | | Nieobecne | | | P |
|---------------------------------------|--------|---------|-------|-------|-----------|-------|-------|----------|
| | | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max | |
| Ostra faza choroby | | | | | | | | |
| Gorączka | anti-N | 84,265 | 0,08 | 275,3 | 22,55 | 0,061 | 239,9 | 0,05 |
| | anti-S | 1770 | 4,81 | 98900 | 799 | 4,81 | 74400 | 0,000004 |
| Suchy kaszel | anti-N | 88,79 | 0,061 | 275,3 | 43,495 | 0,062 | 259 | 0,000393 |
| | anti-S | 1630 | 4,81 | 74400 | 1160 | 4,81 | 98900 | 0,014365 |
| Mokry kaszel | anti-N | 104,1 | 0,48 | 275,3 | 61,34 | 0,061 | 259 | 0,023386 |
| | anti-S | 1490 | 19,4 | 39900 | 1420 | 4,81 | 98900 | NS |
| Duszność | anti-N | 98,2 | 0,062 | 256 | 41,27 | 0,061 | 275,3 | 0,001 |
| | anti-S | 1650 | 4,81 | 98900 | 1255 | 4,81 | 39500 | 0,003383 |
| Desaturacja | anti-N | 109,5 | 0,906 | 247,2 | 42,88 | 0,061 | 275,3 | 0 |
| | anti-S | 1960 | 49,9 | 98900 | 1185 | 4,81 | 39900 | 0,000904 |
| Zmęczenie | anti-N | 85,31 | 0,062 | 275,3 | 10,6 | 0,061 | 253,8 | 0 |
| | anti-S | 1630 | 4,81 | 98900 | 787,5 | 4,81 | 28100 | 0,000685 |
| Katar | anti-N | 82,29 | 0,08 | 259 | 66,66 | 0,061 | 275,3 | 0,042404 |
| | anti-S | 1505 | 4,81 | 98900 | 1420 | 4,81 | 74400 | NS |
| Ból mięśni | anti-N | 88,79 | 0,062 | 275,3 | 40,13 | 0,061 | 253,8 | 0,000005 |
| | anti-S | 1390 | 4,81 | 74400 | 1605 | 4,81 | 98900 | NS |
| Ból gardła | anti-N | 67,2 | 0,061 | 259 | 70,87 | 0,062 | 275,3 | NS |
| | anti-S | 1720 | 5,5 | 54200 | 1300 | 4,81 | 98900 | NS |
| Ból w klatce piersiowej | anti-N | 93,9 | 0,062 | 256 | 64,64 | 0,061 | 275,3 | 0,013142 |
| | anti-S | 1690 | 4,81 | 39900 | 1365 | 4,81 | 98900 | NS |
| Utrata węchu | anti-N | 85,875 | 0,061 | 259 | 52,03 | 0,062 | 275,3 | 0,00075 |
| | anti-S | 1475 | 5,5 | 98900 | 1180 | 4,81 | 70400 | NS |
| Ból głowy | anti-N | 93,92 | 0,062 | 275,3 | 38,045 | 0,061 | 253,8 | 0,00002 |
| | anti-S | 1420 | 4,81 | 98900 | 1430 | 4,81 | 70400 | NS |
| Dreszcze | anti-N | 84,18 | 0,062 | 259 | 53,26 | 0,061 | 275,3 | 0,001321 |
| | anti-S | 1670 | 4,81 | 39900 | 1240 | 4,81 | 98900 | 0,030677 |
| Zaburzenia zakrzepowo-zatorowe | anti-N | 144,7 | 0,541 | 235,4 | 66,66 | 0,061 | 275,3 | 0,017942 |
| | anti-S | 1630 | 98,2 | 70400 | 1425 | 4,81 | 98900 | NS |
| Biegunka | anti-N | 84,77 | 2,53 | 244,1 | 67,74 | 0,061 | 275,3 | NS |
| | anti-S | 1215 | 19,4 | 74400 | 1450 | 4,81 | 98900 | NS |
| Zmiany skórne | anti-N | 121,5 | 0,184 | 235,4 | 67,74 | 0,061 | 275,3 | NS |
| | anti-S | 1130 | 33,8 | 4290 | 1430 | 4,81 | 98900 | NS |

Tabela 15. Miano przeciwciał anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu u pacjentów pod względem objawów 6 miesięcy po chorobie.

| Objawy | | Obecne | | | Nieobecne | | | P |
|--|--------|---------|-------|-------|-----------|-------|-------|----------|
| | | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max | |
| 6 miesięcy po przebyciu choroby | | | | | | | | |
| Suchy kaszel | anty-N | 88,79 | 0,184 | 275,3 | 65,71 | 0,069 | 259 | 0,020305 |
| | anty-S | 1980 | 18,1 | 74400 | 1250 | 4,81 | 98900 | 0,018231 |
| Mokry kaszel | anty-N | 100,3 | 0,184 | 156,9 | 70,57 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 1120 | 19,4 | 37800 | 1620 | 4,81 | 98900 | NS |
| Duszność | anty-N | 103,05 | 0,078 | 256 | 57,84 | 0,069 | 275,3 | 0,001504 |
| | anty-S | 1955 | 19,4 | 74400 | 1350 | 4,81 | 98900 | 0,00767 |
| Zmęczenie | anty-N | 92,055 | 0,078 | 259 | 16,01 | 0,069 | 275,3 | 0 |
| | anty-S | 1810 | 18,1 | 98900 | 747 | 4,81 | 37800 | 0,000035 |
| Zaburzenia pamięci | anty-N | 88,325 | 0,53 | 253,8 | 59,82 | 0,069 | 275,3 | 0,007626 |
| | anty-S | 1720 | 31,3 | 74400 | 1315 | 4,81 | 98900 | 0,027407 |
| Bóle głowy | anty-N | 85,31 | 0,184 | 256 | 66,28 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 1620 | 19,4 | 74400 | 1510 | 4,81 | 98900 | NS |
| Zaburzenia koncentracji | anty-N | 92,095 | 0,184 | 253,8 | 59,82 | 0,069 | 275,3 | 0,015798 |
| | anty-S | 1570 | 19,4 | 98900 | 1505 | 4,81 | 70400 | NS |
| Utrata węchu | anty-N | 93,98 | 0,184 | 259 | 58,83 | 0,069 | 275,3 | 0,012901 |
| | anty-S | 1300 | 23 | 98900 | 1690 | 4,81 | 70400 | NS |
| Zaburzenia ciśnienia tętniczego | anty-N | 137,4 | 2,18 | 247,2 | 65,9 | 0,069 | 275,3 | 0,007526 |
| | anty-S | 2045 | 155 | 70400 | 1460 | 4,81 | 98900 | NS |
| Zaburzenia rytmu serca | anty-N | 73,82 | 2,97 | 203 | 67,74 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 1245 | 19,4 | 26800 | 1625 | 4,81 | 98900 | NS |
| Zaburzenia lękowe | anty-N | 142,5 | 2,53 | 253,8 | 65,805 | 0,069 | 275,3 | 0,005955 |
| | anty-S | 1760 | 19,4 | 37800 | 1490 | 4,81 | 98900 | NS |
| Powikłania zakrzepowo-zatorowe | anty-N | 139,7 | 19,94 | 203 | 67,5 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 1270 | 181 | 38000 | 1570 | 4,81 | 98900 | NS |
| Bóle stawów | anty-N | 98,07 | 0,66 | 256 | 65,805 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 1190 | 19,4 | 37800 | 1650 | 4,81 | 98900 | NS |
| Zmiany skórne | anty-N | 57,38 | 0,53 | 121,5 | 70,655 | 0,069 | 275,3 | NS |
| | anty-S | 4090 | 33,8 | 6580 | 1490 | 4,81 | 98900 | NS |

6.2.1 Porównanie miana przeciwciał anty-N pomiędzy falami

Analiza osób spoza populacji ogólnej (Grupa IIb), które wytworzyły przeciwciała anty-N i nie zgłaszały przebycia COVID-19, wykazała obecność przeciwciał u 2/11 (18%) po fali 1 pandemii, 14/85 (16,5%) po fali 2, 22/132 (16,7%) po fali 3 i 97/307 (31,6%) po fali 4. Analiza pacjentów z Grupy IIb wykazała różnicę w mianie przeciwciał anty-N u pacjentów po falach 1, 2 i 3 w porównaniu z falą 4. Porównanie przeciwciał anty-N podczas fali 1 wykazało różnice między Grupą I a IIb ($p < 0,05$). Podczas 2 fali wystąpiły istotne statystycznie różnice między Grupą I a IIb. Podczas fali 3 wystąpiły istotne statystycznie różnice między Grupą I a IIa oraz Grupą I a IIb, a także II a z IIb. W fali 4 istniały istotne statystycznie różnice między Grupą I a IIb oraz IIa z IIb (Tabela 16a i Tabela 16b).

Tabela 16a. Porównanie miana przeciwciał anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu między falą I i II.

| Grupa | | Fala 1 | | | Fala 2 | | |
|-------|--------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max |
| I | Anty-N | 74,4 | 0,08 | 222,9 | 76,1 | 0,08 | 275,3 |
| | Anty-S | 845,5 | 4,8 | 74400 | 2020 | 4,8 | 39900 |
| IIa | Anty-N | - | - | - | 19,8 | 9,1 | 100,4 |
| | Anty-S | - | - | - | 169 | 41,8 | 291 |
| IIb | Anty-N | 0,0625 | 0,059 | 24 | 0,078 | 0,069 | 133,5 |
| | Anty-S | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 47,1 | 4,8 | 4330 |

Tabela 16b. Porównanie miana przeciwciał anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu między falą III i IV.

| Grupa | | Fala 3 | | | Fala 4 | | |
|-------|--------|---------|-------|-------|---------|------|-------|
| | | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max |
| I | Anty-N | 103,3 | 0,9 | 247,2 | 174,3 | 3,0 | 245,3 |
| | Anty-S | 1035 | 30,2 | 98900 | 2000 | 19,4 | 32700 |
| IIa | Anty-N | 6,6 | 0,1 | 156,4 | 53,3 | 0,06 | 259 |
| | Anty-S | 364 | 4,8 | 13000 | 1520 | 4,8 | 39500 |
| IIb | Anty-N | 0,084 | 0,056 | 236,3 | 2,4 | 0,05 | 293,3 |
| | Anty-S | 419 | 4,81 | 28100 | 1800 | 4,81 | 53936 |

6.2.2 Porównanie miana przeciwciał anti-S między falami

Porównanie miana przeciwciał anti-S w fali 1 wykazało różnice między Grupą I a IIb ($p < 0,05$). W fali 2 zaobserwowano istotne statystycznie różnice między Grupą I a IIb, podobnie jak w przypadku przeciwciał anti-N. W fali 3 wystąpiły istotne statystycznie różnice między Grupą I a IIa oraz Grupą I a IIb. W fali 4 nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami (Tabela 16a i Tabela 16b). Porównanie miana przeciwciał anti-N między falami w Grupie II wykazało istotne statystycznie różnice między falą 4 a pozostałymi falami ($p < 0,05$). Jednakże, większa liczba różnic zaobserwowana została w przypadku analizy miana przeciwciał anti-S. Porównanie miana przeciwciał anti-S między falami w Grupie II wykazało istotne statystycznie różnice między falami 1 a 3 oraz 4, falami 2 a 3 oraz 4 ($p < 0,05$). Potwierdza to obserwowany trend, że masowe szczepienia populacji rozpoczęły się po pierwszej fali, podczas gdy masowe zachorowania na COVID-19 wzrosły po fali Omikron.

6.2.3 Miano przeciwciał anti-N i anti-S u pacjentów zaszczepionych w porównaniu do nieszczepionych

Analiza miana przeciwciał anti-N i anti-S u pacjentów zaszczepionych i nieszczepionych wykazała różnice w mianie przeciwciał anti-S w grupie I i II oraz przeciwciał anti-N w grupie II (Tabela 17). Jedynie miano przeciwciał anti-N nie różniło się między pacjentami zaszczepionymi a nieszczepionymi.

Tabela 17. Miano przeciwciał anti-S i anti-N 6 miesięcy po zakażeniu u zaszczepionych i nieszczepionych.

| | Zaszczepieni | | | Nieszczepieni | | | P |
|---------------------------------|--------------|------|-------|---------------|------|-------|---------|
| | Średnia | Min | Max | Średnia | Min | Max | |
| Miano przeciwciał anti-S | | | | | | | |
| Pacjenci | 97,4 | 0,08 | 275,3 | 103,3 | 2,53 | 233,6 | NS |
| Populacja | 1,5 | 0,05 | 293,3 | 15,8 | 0,05 | 259 | 0,00079 |
| Miano przeciwciał anti-N | | | | | | | |
| Pacjenci | 4360 | 245 | 98900 | 535,5 | 19,4 | 5020 | 0,00001 |
| Populacja | 1690 | 4,8 | 52600 | 100 | 4,8 | 53936 | 0,0001 |

7. Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań dodają nowej wiedzy na temat odpowiedzi immunologicznej przeciwko SARS-CoV-2 w polskiej populacji. We własnej analizie zaobserwowano, że odpowiedź immunologiczna po zakażeniu COVID-19 utrzymuje się, przez co najmniej ponad pół roku, a miano przeciwciał jest wyższe u osób z ciężkim przebiegiem choroby i zaszczepionych niż u osób bezobjawowych lub skąpoobjawowych. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności między odpowiedzią immunologiczną a płcią. Na podstawie własnej analizy zaobserwowano, że istnieje korelacja między wytwarzaniem przeciwciał a nasileniem stanu zapalnego w ostrym okresie choroby. Identyfikacja osób z dodatnim mianem przeciwciał bez wywiadu przebytego COVID-19 pokazuje skalę występowania bezobjawowych przypadków zakażenia. Badania serologiczne analizowane w trakcie badania są przydatne w kontroli pandemii i z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Analizowano związek wytwarzania przeciwciał z zależnościami od różnych czynników, w tym płci. Dane w literaturze dotyczące związku między produkcją przeciwciał a płcią są niejednoznaczne. Natomiast w przeprowadzonych badaniach własnych nie zaobserwowano różnic w wytwarzaniu przeciwciał w zależności od płci, co również dostarcza nowych informacji. Od marca 2020 roku SARS-CoV-2 był odpowiedzialny za 428 mln zakażeń i 5,91 mln zgonów [148]. Terpos i wsp., obserwowali, że płeć żeńska i młody wiek predysponują do intensywniejszej odpowiedzi immunologicznej po przechorowaniu COVID-19 [149]. Niemniej jednak nie zaobserwowaliśmy tej korelacji w naszym badaniu.

Amorim i wsp. w badaniu przeprowadzonym w Brazylii, obserwowali, że mężczyźni mieli nieco wyższą seroprevalencję, niż kobiety (odpowiednio 4,1% w porównaniu do 3,5%), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie (OR 1,20, 95% CI 0,82–1,76) [150]. Podobny trend zaobserwowano we francuskim badaniu, przeprowadzonym przez Gallian i wsp., w którym seroprevalencja była wyższa u mężczyzn niż u kobiet, ale nie różniła się istotnie (2,82% w porównaniu do 2,69%) [151]. Różnice w występowaniu przeciwciał obserwowane w materiale własnym nie zależały od płci, co jest zgodne z wynikami badań innych autorów [152]. Havers i wsp. przetestowali 16 025 próbek surowicy pobranych na dużym obszarze Stanów Zjednoczonych Ameryki włączając do badania duże miasta, obejmujące niektóre przedmieścia lub obszary podmiejskie (m.in. Nowy Jork, Louisiana, Południowa Floryda,

Filadelfia, Missouri, San Francisco, Minnesota), nie wykazując wyraźnej zależności między seroprewalencją a płcią w poszczególnych miejscach [153].

Najskuteczniejszym sposobem zapobiegania COVID-19 jest szczepienie. Jednym z potencjalnych problemów w zarządzaniu pacjentami z COVID-19 jest brak danych dotyczących dynamiki przeciwciał neutralizujących w populacji, co mogłoby dostarczyć przydatnych informacji dla przyszłych zmian w zaleceniach dotyczących szczepień.

Skuteczność szczepień została wykazana w wielu badaniach, a szczepienie prawdopodobnie zapewnia większą ochronę niż zakażenie naturalne. Szczepionka prawdopodobnie również wystarcza, aby wywołać wtórne wzmacniającą odpowiedź immunologiczną u ozdowieńców po COVID-19, którzy są seropozytywni w klasie IgG przeciwko S-RBD (domenie wiążącej receptor) [154, 155, 156, 157, 158, 159]. U zaszczepionych pacjentów we własnej analizie zaobserwowano silny wzrost miana przeciwciał między trzecim a czwartym punktem czasowym pobrania krwi, co świadczy o efekcie wzmacniającym odpowiedź immunologiczną po szczepieniu, podczas gdy w grupie nieszczepionej wzrost miana był znacznie niższy.

Ogólny odsetek szczepień w Polsce w chwili przeprowadzenia ostatnich analiz (październik 2022 roku) wynosił 56,75%. We własnej analizie populacji uczestniczącej w badaniu odsetek ten był podobny (58,63%). Analiza przeciwciał anty-N i anty-S pacjentów zaszczepionych w porównaniu z nieszczepionymi wykazała różnice w przeciwciałach anty-S i anty-N w przypadku pacjentów z kohorty badania populacyjnego oraz przeciwciał anty-S u osób po przebytych COVID-19. Zaszczepiona populacja była znacząco starsza niż nieszczepiona. Co ciekawe, jeden procent pacjentów zaszczepionych nie wytworzył przeciwciał anty-S i było to częściej obserwowane u pacjentów starszych. Wyniki przedstawionych w tej pracy badań są zgodne z wynikami Hagg i wsp., którzy zauważyli, że odporność poszczepienna przeciwko SARS-CoV-2 słabnie z czasem i jest niższa w starszej populacji [160].

Zarówno starsi pacjenci, jak i ci z istniejącymi chorobami współistniejącymi, wykazywali słabszą odpowiedź humoralną po szczepieniu. Potwierdzają to badania Notarte i wsp., dotyczące pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek poddawanych przewlekłej hemodializoterapii, którzy również wykazywali znacząco niższe miana przeciwciał po szczepieniu [161].

W badaniu własnym porównano miano przeciwciał anti-N i anti-S i zaobserwowano wyższe miano przeciwciał anti-N u pacjentów wymagających hospitalizacji w porównaniu z pacjentami, którzy nie wymagali hospitalizacji, co odzwierciedla obserwacje innych autorów. Ciekawym odkryciem płynącym z niniejszego badania jest fakt, że w pierwszych trzech falach obserwowano wyższe miano przeciwciał anti-S u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19, ale nie po 4 fali. Ponadto interesujące jest to, że porównanie różnic w mianie przeciwciał wykazało wiele związków z objawami w fazie ostrej choroby, co jest bezpośrednio związane z przebiegiem choroby, ale także może być związane z utrzymującymi się objawami, które są składnikami tzw. zespołu Long-COVID-19.

Większość pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2 jest bezobjawowa lub ma łagodne objawy, podczas gdy u mniejszości choroba przybiera ciężki przebieg z zespołem ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), rozległym stanem zapalnym i tzw. „burzą cytokinową”. Pacjenci z objawami o ciężkim przebiegu wymagają hospitalizacji [162]. Przeciwciała są wykrywalne już od 6 dnia po potwierdzeniu zakażenia za pomocą testu PCR. Przeciwciała głównie ukierunkowane są przeciwko białku kolca (S) i nukleokapsydowemu (N) wirusa SARS-CoV-2 [163]. Białko S jest głównym czynnikiem odporności ochronnej, natomiast monoklonalne przeciwciała przeciwko białku S mogą neutralizować zakaźność wirusa [164, 165]. Na tej podstawie Walls i wsp. wnioskowali, że ekspozycja na SARS-CoV-2 może wywołać wzajemnie krzyżowo reaktywne, potencjalnie neutralizujące przeciwciała [166]. Białko N znajduje się w jądrze wirusa. Nie opisano jeszcze wpływu wysokich mian IgG przeciwko białku N na wyniki kliniczne choroby wywołanej przez wirusa SARS-CoV-2.

Ozdrowieńcy po COVID-19 stanowią ważną grupę, ponieważ wciąż nie wiadomo, jakie czynniki wpływają na odpowiedź immunologiczną gospodarza i czy ci pacjenci są nawet częściowo odporni na ponowne zakażenie. Przeprowadzona analiza wykazała, że wszyscy badani ozdrowieńcy wytworzyli przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2.

Zakażenie SARS-CoV-2 prowadzi do wytwarzania przeciwciał, nawet u pacjentów całkowicie bezobjawowych. Jednak początkowa odpowiedź immunologiczna nie jest tak silna jak u pacjentów z cięższym przebiegiem choroby. Niniejsza analiza potwierdza obserwacje innych autorów dotyczące odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu SARS-CoV-2. Choe i wsp. oceniali wytwarzanie przeciwciał u 58 osób w Korei Południowej i odkryli, że u pacjentów bezobjawowych lub łagodnie objawowych, przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2 nadal były wykrywalne po 8 miesiącach od zakażenia (anti-N pan-Ig u 91,4%, anti-N IgG u 25,9%, anti-S IgG u 86,2%, a anti-S1 IgG u 69,0%) [167].

W przeprowadzonym badaniu pacjenci z ciężkim przebiegiem COVID-19 wykazali silniejszą odpowiedź immunologiczną, co wskazuje wyższy współczynnik miana przeciwciał w punkcie czasowym pobrania materiału II/I i wyższe mediany miana przeciwciał 3 miesiące po zakażeniu. Jest to zgodne z obserwacją Trogakos i wsp., którzy stwierdzili, że ciężki przebieg COVID-19 (w porównaniu z chorobą o umiarkowanym nasileniu) wywołuje wcześniejszą i bardziej intensywną odpowiedź immunologiczną u pacjentów hospitalizowanych [168]. Miano przeciwciał pozostaje na wysokim poziomie u ozdrowieńców po COVID-19. Podobnie jak Choe i wsp., zauważono, że nawet u pacjentów z łagodnymi objawami miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 nie zmniejszało się istotnie po 6 miesiącach.

W przedstawionym w tej pracy badaniu zauważono również korelację odpowiedzi immunologicznej miesiąc po zakażeniu z wszystkimi istotnymi wskaźnikami zapalnymi we krwi (CRP, D-dimery, IL-6), co dodatkowo potwierdza wpływ nasilenia choroby na humoralną odpowiedź immunologiczną. Hartley i wsp. wykazali, że pacjenci z COVID-19 szybko generują pamięć komórek B zarówno do antygenów kolca, jak i nukleokapsydu po zakażeniu wirusem SARS-CoV-2. Zauważono, że miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 maleje w czasie, a to zmniejszenie odzwierciedla fazę spadku odpowiedzi immunologicznej [169].

Liczne badania sugerują, że miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 są związane z nasileniem COVID-19 [170, 171, 172, 173, 174, 175]. Kurano wsp. zauważyli, że poziomy wszystkich mierzonych elementów odpowiedzi immunologicznej były wyższe w grupie pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 [176].

Słabsza odpowiedź immunologiczna w postaci niższego miana przeciwciał u pacjentów z łagodnymi objawami w porównaniu z tymi o cięższym przebiegu choroby zostały zauważone przez Long i wsp. oraz Chen i wsp. w przypadku zakażenia wirusem SARS-CoV-2, jak i w przypadku innych infekcji koronawirusowych, takich jak MERS-CoV [177, 178].

Podczas trwania badania skorzystano z danych zintegrowanego procesu monitorowania w czasie rzeczywistym (RT) dla poszczególnych wariantów i mapy mutacji SARS-CoV-2 "RT-COVAR" do retrospektywnej analizy wariantów SARS-CoV-2 wpływających na populację polską w analizowanym okresie [179]. Na poziomie krajowym, wirtualna mapa "RT-COVAR" była codziennie wykorzystywana przez Ministerstwo Zdrowia

i Narodowy Instytut Higieny do tworzenia polityki epidemiologicznej kraju. Dane dotyczące różnorodności genomu wirusa SARS-CoV-2 w Polsce są wykorzystywane przez globalne bazy danych, takie jak GISAID, które następnie są wykorzystywane do tworzenia specjalnych zaleceń przez instytucje takie jak FDA czy WHO. Analizując okres czasowy przeprowadzonego badania, wysunięto wniosek, że dominowały wówczas warianty typu dzikiego oraz wariantami Alfa i Delta. Przeprowadzone badanie własne w tym zakresie przyniosło nową wiedzę na temat odpowiedzi immunologicznej w zależności od wariantów wirusa.

W II etapie analiz, włączenie do badań lokalnej populacji oraz oznaczanie seroprewalencji pozwoliło na zrozumienie przebiegu pandemii COVID-19 w badanej grupie osób oraz jej wpływu na stan zdrowia publicznego. W przeprowadzonym badaniu obserwowano stopniowy wzrost częstości występowania przeciwciał IgG anty-N i anty-S 6 miesięcy po zakażeniu, osiągając 92,5% i 69,7% odpowiednio po fali z przewagą wariantu Omikron. Te wyniki pokazują trwałość odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu SARS-CoV-2 oraz odzwierciedlają skalę zakażeń w populacji.

Interesujące jest również zidentyfikowanie osób z przeciwciałami anty-N, pomimo braku zgłoszenia COVID-19. Wyniki te sugerują obecność bezobjawowych przypadków COVID-19 w badanej populacji. To zjawisko występuje również w przypadku innych wirusów (np. EBV), gdzie białka nukleokapsydowe, takie jak białko N, są silnie immunogenne, co sprawia, że są skutecznymi narzędziami diagnostycznymi do wykrywania infekcji wirusowych [180]. Istnienie bezobjawowych przypadków zakażenia SARS-CoV-2 podkreśla znaczenie skuteczności środków kontroli transmisji i szczepień w zapobieganiu rozprzestrzenianiu się wirusa.

Zgodnie z metaanalizą Bergeri i wsp. ogólna seroprewalencja w populacji światowej gwałtownie wzrosła w 2021 roku z powodu zakażeń w niektórych regionach (np. z 26,6% [24,6% do 28,8%] do 86,7% [84,6% do 88,5%] w Afryce w grudniu 2021 roku) oraz szczepień i zakażeń w innych (np. z 9,6% [8,3% do 11,0%] w czerwcu 2020 roku do 95,9% [92,6% do 97,8%] w grudniu 2021 roku w krajach o wysokim dochodzie w Europie. Po pojawieniu się Omikrona w marcu 2022 roku, seroprewalencja indukowana przez zakażenie wzrosła do 47,9% [41,0% do 54,9%] w krajach wysokorozwiniętych w Europie i do 33,7% [31,6% do 36,0%] w krajach wysokorozwiniętych w Ameryce. Od lipca do września 2021 roku mediany seroprewalencji do zachorowalności wynosiły od około 2:1 w Ameryce i krajach wysoko rozwiniętych w Europie, do ponad 100:1 w Afryce [181]. Wyniki te są

zgodne z przeprowadzonym badaniem, gdzie również zaobserwowano stopniowy wzrost seroprewalencji przeciwciał anty-N i anty-S (anty-N - 10%, 17,9%, 27% odpowiednio po każdej z trzech fal, anty-S - 0, 29,5%, 82,4% odpowiednio po każdej z trzech fal).

W miarę postępu pandemii różnice między obecnością przeciwciał w grupie osób po przechorowaniu a populacją zacierają się. Możliwy jest w tej sytuacji wpływ szczepień lub zakażeń bezobjawowych. Po wprowadzeniu szczepień (po drugiej fali) różnica w mianie przeciwciał anty-S znika. Niniejsza analiza dostarcza informacji na temat zmian w seroprewalencji w czasie pandemii. Wyniki uzyskane na podstawie własnych obserwacji są podobne do wyników uzyskanych przez Castilla i wsp., którzy przeprowadzili analizę w Nawarze, Hiszpanii, w maju 2022 roku, obserwując seroprewalencję przeciwciał anty-N i anty-S SARS-CoV-2 na poziomie odpowiednio 58,9% i 92,7% [182]. Badanie przeprowadzone w Japonii sugeruje wzrost seroprewalencji do ponad 90% w lutym 2022 roku [183].

W Afryce ogólna seroprewalencja SARS-CoV-2 przed trzecią falą (BD5), skorygowana pod kątem wrażliwości i specyficzności testu, wynosiła 26% na terenach wiejskich i 41% w społecznościach miejskich. Po trzeciej fali ogólna seroprewalencja wzrosła do 60% na terenach wiejskich i 70% w społecznościach miejskich [184].

Wyniki bieżącej pracy pozwoliły na obserwację, że 9% populacji wytworzyło przeciwciała anty-S, a 17,4% wytworzyło przeciwciała anty-N pomimo braku wywiadu choroby czy przebytego szczepienia. Analiza pacjentów bezobjawowych i skąpoobjawowych, którzy nie zgłaszali choroby, ale wytworzyli przeciwciała anty-N w każdej fali, pokazała wzrastającą obecność przeciwciał, z najwyższym odsetkiem po fali Omikron, sięgającym do 31,6%. Odzwierciedla to skalę zakażeń bezobjawowych w społeczeństwie. Zakażenia bezobjawowe wciąż stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego, co należy podkreślić i stale podkreślać. Istotne jest przeprowadzanie badań przesiewowych w celu uzyskania większej wiedzy na temat zakażeń bezobjawowych i wykrywania ich jak najszybciej, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się pandemii. Wang i wsp. w swoim raporcie pokazali, że zakażenia bezobjawowe stanowią, co najmniej jedną trzecią wszystkich przypadków, podczas gdy na podstawie przeglądu systematycznego i metaanalizy odsetek ten wynosi około jednej piątej [185].

Zaobserwowano, że substytucje w białkach kolca dominujących wariantów SARS-CoV-2 umożliwiają unikanie wytworzonej odporności. He i wsp. zauważyli, że niektóre

substytucje, w tym L452R (obecne w wariantcie Delta), upośledzają wiązanie przeciwciała-antygen, umożliwiając wirusom ucieczkę. Autorzy zauważyli, że pierwsze warianty Omikrona były wrażliwe na przeciwciało R1-32, ale pojawiły się i szybko rozprzestrzeniły się podwarianty, które zawierały L452R [186].

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano niższą odpowiedź anti-S 6 miesięcy po zakażeniu wariantem Delta w porównaniu z innymi wariantami, w tym Omikronem. Ta obserwacja wymaga dalszych badań.

Badania metodą serologiczną opierają się na wykrywaniu przeciwciał specyficznych dla SARS-CoV-2, które są produkowane przez układ odpornościowy. Wzrost miana przeciwciał skierowanych przeciwko SARS-CoV-2 następuje później niż zakażenie (okno serologiczne), dlatego testy serologiczne nie są odpowiednie do wykrywania COVID-19 w pierwszej fazie choroby [187]. Testy serologiczne są bardziej odpowiednie w obserwacjach epidemiologicznych. Ponadto pomagają poprawić dokładność diagnozy COVID-19. Kolejnym istotnym ograniczeniem testów serologicznych jest krzyżowa reaktywność IgM i IgG skierowanych przeciwko innym wirusom [188]. Należy podkreślić, że 90% podobieństwa białek N SARS-CoV i SARS-CoV-2 może prowadzić do wysokiej krzyżowej reaktywności z tym antygenem. Potwierdzona krzyżowa reaktywność została również zauważona między SARS-CoV-2 a antygenem wirusa Dengi.

Ograniczeniem przeprowadzonego badania w I etapie była mała grupa pacjentów (szczególnie z łagodnym przebiegiem COVID-19). Kolejnym ograniczeniem niniejszej analizy było to, że pacjenci biorący udział w badaniu byli w wieku średnim lub starszym, a bardzo mało danych jest dostępnych dotyczących młodych osób bezobjawowych lub z łagodnym przebiegiem choroby. Jednakże, pacjenci hospitalizowani zazwyczaj są starsi niż pacjenci bezobjawowi lub z łagodnymi objawami. Ponieważ przeprowadzone badanie własne skoncentrowało się głównie na pacjentach hospitalizowanych, zebrane dane odzwierciedlają wyniki w tych grupach wiekowych. Proces szczepień w badanej grupie był również niejednolity, a pacjenci byli szczepieni w różnych punktach czasowych pobrań próbek do badań (między 3 a 6 miesiącem), co mogło wpłynąć na wyniki. Ponadto, interesujące byłoby poznanie dokładnego wpływu wariantu SARS-CoV-2 na intensywność odpowiedzi immunologicznej, niestety jednak nie dysponowano takimi danymi, co uważane jest za kolejne ograniczenie badania.

Ograniczeniem badań serologicznych jest brak możliwości oceny pełnego spektrum odpowiedzi immunologicznej, w szczególności komórkowej odporności mediowanej przez limfocyty T.

Do ograniczeń przeprowadzonego badania zalicza się jego retrospektywny charakter oraz brak danych dotyczących długoterminowej trwałości odpowiedzi immunologicznej.

Bardzo dynamicznie zmieniająca się sytuacja epidemiologiczna podczas trwania analiz, miała odzwierciedlenie w stosunkowo niewielkich grupach osób ocenianych w każdym okresie czasu, dlatego możliwość wiarygodnej oceny interakcji między różnymi zmiennymi klinicznymi a mianem przeciwciał była ograniczona. Ponadto nie posiadano danych dotyczących ponownego zakażenia, co mogło wpłynąć na wyniki, szczególnie w okresie fali Omikron.

Mimo że pandemia COVID-19 obecnie jest mniej istotnym problemem, wiedza na temat ludzkiej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusem SARS-CoV-2 może być wykorzystana w przyszłości w kontekście innych koronawirusów. W niniejszej analizie nie posiadano dostępu do informacji na temat rodzaju stosowanej szczepionki, co może być również istotne w zdobywaniu nowej wiedzy na temat odpowiedzi immunologicznej na wirusa SARS-CoV-2.

Nowością, jak i różnicą przeprowadzonego badania w porównaniu z innymi badaniami nad immunologią w COVID-19 jest fakt, że odbyło się w unikalnym okresie czasu, gdy pandemia ewoluowała, a próbki pobierano w różnych okresach pandemii, z dominacją różnych podtypów wirusa. Ponadto, unikalnym aspektem jest dostęp do dużej bazy danych populacyjnych ocenianych jednocześnie, ponieważ zebrano próbki od pacjentów cierpiących na tę chorobę, jak i od osób z ogólnej populacji.

Zaletą prezentowanego badania była jego złożoność i możliwość porównania występowania przeciwciał anty-N i anty-S sześć miesięcy po każdej fali pandemii w lokalnej populacji oraz u pacjentów, którzy wyzdrowieli z COVID-19. Wyniki przeprowadzonej analizy dobrze odzwierciedlają sytuację w polskiej populacji w danym przedziale czasowym i dodają istotnych informacji na temat seropozytywności w pandemii COVID-19. Ta wiedza może być przydatna w przyszłości.

Przyszłe trendy w diagnostyce, zwłaszcza w zakresie testów typu multiplex, odgrywają kluczową rolę w szybkim i dokładnym wykrywaniu chorób, szczególnie

w kontekście pandemii COVID-19. Testy serologiczne typu multiplex są cennymi narzędziami w diagnostyce i monitorowaniu infekcji wirusowych układu oddechowego, w tym COVID-19, grypy i RSV (syncytialnego wirusa oddechowego). Pozwalają one na jednoczesne wykrywanie i pomiar wielu przeciwciał przeciwko różnym patogenom wirusowym w jednej próbce. Ta zdolność niesie ze sobą kilka korzyści pod względem efektywności, opłacalności i możliwości różnicowania między różnymi zakażeniami. W kontekście grypy, COVID-19 i RSV testy multiplex odgrywają kluczową rolę w szybkim i dokładnym identyfikowaniu czynników sprawczych infekcji układu oddechowego [189].

Badania serologiczne stanowią istotne narzędzie diagnostyczne, pomocne w strategii kontroli pandemii, umożliwiając wykrywanie oraz ilościowe oznaczanie miana przeciwciał przeciwko pojedynczemu antygenowi. W przeszłości powszechnie stosowane testy enzymatyczne typu ELISA zostały zastąpione przez nowoczesne technologie badań serologicznych, w tym testy wieloantygenowe, które obecnie są masowo wykonywane [190].

Nowe technologie, takie jak testy serologiczne typu multiplex, oferują przewagę w porównaniu do poprzednich metod poprzez możliwość pomiaru wielu przeciwciał w jednej próbce materiału biologicznego, co umożliwia bardziej wszechstronne i skuteczne analizy. Testy multiplex pozwalają na jednoczesne wykrywanie różnych przeciwciał przeciwko różnym antygenom oraz są bardziej opłacalne [191].

Wczesne i właściwe diagnozowanie pacjentów jest kluczowe dla skutecznej kontroli zakażeń, zarządzania podczas trwania epidemii oraz zapewnienia odpowiedniej opieki osobom dotkniętym infekcją. Testy typu multiplex, które jednocześnie wykrywają grypę, COVID-19 i RSV w jednej próbce, oferują kilka korzyści w diagnostyce i leczeniu infekcji układu oddechowego. Poprzez usprawnienie procesu testowania i dostarczanie kompleksowych wyników, te testy umożliwiają pracownikom ochrony zdrowia podejmowanie świadomych decyzji dotyczących opieki nad pacjentami oraz wprowadzania odpowiednich środków kontroli zakażeń [192, 193]. Pandemia COVID-19 przyspieszyła rozwój diagnostyki multiplex, w szczególności dla patogenów układu oddechowego [194].

Wnioski płynące z przedstawionej pracy mają istotne znaczenie dla strategii kontroli pandemii COVID-19, jak i pandemii wywołanych innymi czynnikami chorobotwórczymi, które mogą wystąpić w przyszłości. Oprócz oceny skuteczności szczepień przeciwko SARS-CoV-2, istotne jest również monitorowanie odpowiedzi immunologicznej populacji po

przebyłym zakażeniu. Badania seroprewalencji w populacji pomagają lepiej zrozumieć dynamikę epidemii i kierować działaniami poprawiającymi zdrowie populacji.

8. Wnioski

1. Humoralna odpowiedź immunologiczna po przechorowaniu COVID-19 utrzymuje się przez co najmniej pół roku.
2. Miano przeciwciał anti-SARS-CoV-2 jest istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z wywiadem ciężkiego przebiegu COVID-19 oraz u osób zaszczepionych.
3. Odpowiedź immunologiczna po przebyciu COVID-19 nie jest zależna od płci.
4. Istnieje istotna statystycznie zależność między wytwarzaniem przeciwciał anti-SARS-CoV-2, a nasileniem stanu zapalnego w ostrym okresie choroby.
5. Identyfikacja osób z dodatnim mianem przeciwciał anti-N bez wywiadu potwierdzonego przebycia COVID-19 podkreśla występowanie bezobjawowych przypadków zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w populacji.
6. Badania serologiczne pełnią ważną funkcję zarówno z punktu widzenia indywidualnego pacjenta, jak i całego społeczeństwa, stanowiąc istotne narzędzie w strategii kontroli pandemii.

9. Streszczenie

Choroby dróg oddechowych, w tym COVID-19, wywoływane przez wirusa SARS-CoV-2, stanowią globalne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Pandemia COVID-19, ogłoszona przez WHO w marcu 2020 roku, znacząco wpłynęła na społeczeństwo, gospodarkę i systemy opieki zdrowotnej. Skuteczne zarządzanie chorobami przenoszonymi drogą kropelkową, wymaga głębokiej wiedzy na temat transmisji, środków zapobiegawczych i strategii leczenia.

Badania przeprowadzono w dwóch etapach, uwzględniając zmieniającą się sytuację pandemiczną. Celem I etapu pracy była ocena obecności przeciwciał anti-SARS-CoV-2 u rekonwalescentów po COVID-19 oraz ich wytwarzaniu w zależności od nasilenia choroby, parametrów zapalnych, płci, wieku i statusu szczepień. W II etapie oceniano częstość występowania przeciwciał w populacji ogólnej podczas czterech fal pandemii oraz różnice w wytwarzaniu przeciwciał między pacjentami a osobami zdrowymi. Analizowano również częstość zakażeń bezobjawowych w oparciu o status przeciwciał anti-N i wywiadu szczepienia. Zgoda na badania została udzielona przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu medycznego w Białymstoku (nr: APK.002.346.2020 oraz APK.002.259.2020).

Do I etapu badań włączono 322 pacjentów (282 hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i 40 pacjentów z łagodnymi objawami COVID-19 izolowanych w domu), obojga płci (165 kobiet i 157 mężczyzn) z wywiadem zakażenia SARS-CoV-2.

W II etapie populacja badanych osób składała się z 2 grup. Do grupy I zakwalifikowano osoby po przebyciu COVID-19 (232 pacjentów, którzy wymagali hospitalizacji). Grupę II stanowiło 544 pacjentów z kohorty badania populacyjnego - Białystok PLUS. Badanie Białystok PLUS dostarcza informacji na temat stanu zdrowia lokalnej społeczności poprzez analizę badań i ankiet przeprowadzonych na starannie wybranej kohorcie reprezentatywnej dla populacji lokalnej. Pacjenci byli oceniani sześć miesięcy po zakażeniu. Do badań wykorzystano krew pacjentów z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 oraz osób z lokalnej populacji.

Wyniki analizy próbek krwi uzyskano standardowymi metodami stosowanymi w badaniach biochemicznych, miano przeciwciał anti-S w klasie IgG oznaczono testem ilościowym LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG, zaś przeciwko białku anti-N za pomocą testu immunologicznego przeznaczonego do jakościowego wykrywania przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 (Elecsys Anti-SARS-CoV-2, COBAS).

Stwierdzono, że humoralna odpowiedź immunologiczna po zakażeniu SARS-CoV-2 utrzymuje się przez ponad 6 miesięcy. Zaobserwowane miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 jest istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z wywiadem ciężkiego przebiegu COVID-19 i osób zaszczepionych. Jednocześnie obserwowano istotną statystycznie korelację między produkcją przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2, a nasileniem stanu zapalnego w ostrym okresie choroby. Stwierdzono, że odpowiedź immunologiczna po zakażeniu COVID-19 nie zależy od płci. Identyfikacja osób z dodatnim mianem przeciwciał anty-N, bez wywiadu COVID-19, podkreśla skalę istnienia bezobjawowych przypadków w populacji.

Uzyskane wyniki przeprowadzonej analizy odzwierciedlają sytuację w polskiej populacji w trakcie pandemii. Wyniki dodają istotnych informacji na temat seropozytywności w trakcie trwania pandemii COVID-19 i potwierdzają, że badania serologiczne pełnią ważną funkcję, zarówno z punktu widzenia indywidualnego pacjenta, jak i całego społeczeństwa, stanowiąc istotne narzędzie w strategii kontroli pandemii.

10. Summary

Respiratory diseases, including COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus, pose a global public health challenge. The COVID-19 pandemic, declared by the WHO in March 2020, has significantly impacted society, the economy, and healthcare systems. Effective management of droplet-transmitted diseases, including COVID-19, requires deep understanding of transmission mechanisms, preventive measures, and treatment strategies.

The research was conducted in two stages, taking into account the evolving pandemic situation. The aim of the first stage of this study was to assess the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 convalescents and their production depending on disease severity, inflammatory parameters, gender, age, and vaccination status. In the second stage, the frequency of antibody occurrence in the general population during four pandemic waves was assessed, along with differences in antibody production between patients and healthy individuals. The frequency of asymptomatic infections was also analyzed based on anti-N antibody status and vaccination history. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (approval numbers: APK.002.346.2020 and APK.002.259.2020).

In the first stage, 322 patients (282 hospitalized at the Clinic of Infectious Diseases and Neuroinfections, Medical University of Białystok, and 40 patients with mild COVID-19 symptoms isolated at home), both male and female (165 females and 157 males), with a history of SARS-CoV-2 infection were included.

In the second stage, the study population comprised two groups:

Group I consisted of individuals after COVID-19 (232 hospitalized patients). Patients were evaluated six months after infection. Group II comprised 544 patients from the Białystok PLUS study cohort. The Białystok PLUS study provides information on the local community's health status through analysis of tests and surveys conducted on a carefully selected cohort representative of the local population. Blood samples from patients with confirmed SARS-CoV-2 infection and individuals from the local population were used for the study.

Blood sample analysis results were obtained using standard biochemical methods. Anti-SARS-CoV-2 IgG antibody titers were determined quantitatively using the LIAISON

SARS-CoV-2 S1/S2 IgG assay, while anti-N protein antibodies were detected qualitatively using the Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (COBAS) immunoassay.

The study found that the humoral immune response to SARS-CoV-2 infection persists for over 6 months. The observed anti-S antibody titers against SARS-CoV-2 were significantly higher in patients with a history of severe COVID-19 and vaccinated individuals. Additionally, a statistically significant correlation was observed between antibody production against SARS-CoV-2 and the severity of inflammation during the acute phase of the disease. It was observed, that the immune response to COVID-19 infection was independent of gender. Identification of individuals with positive anti-N antibody titers without a history of COVID-19 underscores the existence of asymptomatic infection cases in the population.

The obtained results reflect the situation in the Polish population during the COVID-19 pandemic. The results provide significant information on seropositivity during the pandemic. The findings confirm that serological studies are essential tools both for individual patients and for the entire society, serving as significant instruments in pandemic control strategies.

11. Spis tabel

| | |
|--|----|
| 1. Tabela 1. Najważniejsze aspekty związane z epidemiologią COVID- 19. | 8 |
| 2. Tabela 2. Typy i charakterystyka przeciwciał badanych przy pomocy badań serologicznych..... | 31 |
| 3. Tabela 3. Charakterystyka typów przeciwciał produkowanych u osób po zakażeniu/szczepieniu..... | 32 |
| 4. Tabela 4. Przykłady wyników testów neutralizacji pseudowirusów stosowanych do monitorowania odpowiedzi przeciwciał neutralizujących (NAbs) u pacjentów zakażonych COVID-19..... | 37 |
| 5. Tabela 5. Charakterystyka demograficzna i status szczepień ogółem oraz w poszczególnych falach pandemii..... | 47 |
| 6. Tabela 6. Parametry laboratoryjne wszystkich pacjentów włączonych do badania podczas hospitalizacji..... | 49 |
| 7. Tabela 7. Miano przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 pacjentów hospitalizowanych..... | 49 |
| 8. Tabela 8. Wyniki badań serologicznych pacjentów w zależności od przebiegu choroby...51 | 51 |
| 9. Tabela 9. Wyniki badań biochemicznych pacjentów w zależności od płci..... | 52 |
| 10. Tabela 10. Wyniki badań serologicznych pacjentów w zależności od płci..... | 52 |
| 11. Tabela 11. Wyniki badań biochemicznych w zależności od wywiadu szczepień..... | 54 |
| 12. Tabela 12. Wyniki badań serologicznych w zależności od wywiadu szczepień..... | 55 |
| 13. Tabela 13. Porównanie miana przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu między pacjentami wymagającymi hospitalizacji a populacją, która nie wymagała hospitalizacji, ale chorowała na COVID-19..... | 58 |
| 14. Tabela 14. Miano przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu u pacjentów pod względem objawów w ostrej fazie choroby..... | 59 |

| | |
|---|----|
| 15. Tabela 15. Miano przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu u pacjentów pod względem objawów 6 miesięcy po chorobie..... | 60 |
| 16. Tabela 16a. Porównanie miana przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu między falą I i II..... | 61 |
| 17. Tabela 16b. Porównanie miana przeciwciał anti-N i anti-S 6 miesięcy po zakażeniu między falą III i IV..... | 61 |
| 18. Tabela 17. Miano przeciwciał anti-S i anti-N 6 miesięcy po zakażeniu u zaszczepionych i niezszczepionych..... | 62 |

12. Spis rycin

| | |
|---|----|
| 1. Rycina 1. Rys historyczny COVID-19 na przestrzeni lat..... | 6 |
| 2. Rycina 2. Możliwości diagnostyczne wykrywania wirusa SARS-CoV-2..... | 20 |
| 3. Rycina 3. Miano przeciwciał IgG anty-SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 o przebiegu skąpoobjawowym w porównaniu z objawowym..... | 50 |
| 4. Rycina 4. Miano przeciwciał IgG anty-SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 w zależności od płci..... | 53 |
| 5. Rycina 5. Miano przeciwciał IgG przeciwko SARS-CoV-2 u osób po zakażeniu COVID-19 wśród pacjentów zaszczepionych i niezaszczepionych przeciwko SARS-CoV-2..... | 54 |
| 6. Rycina 6. Występowanie przeciwciał anti-N i anti-S w populacji we wszystkich falach pandemii COVID-19..... | 56 |

13. Piśmiennictwo

- [1] "Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?". <https://www.who.int> [Dostęp: 13.04.2023].
- [2] Grant MC, Geoghegan L, Arbyn M i in. "The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries". PLOS ONE. 2020; 15(6):e0234765.
- [3] McIntosh K, Hirsch M, Bloom A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. Lancet Infect Dis. 2020; 1:2019–2020.
- [4] SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> [Dostęp: 01.09.2023].
- [5] Lu R. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet. 2020; 395:565–574.
- [6] Thomas S. The Structure of the membrane protein of SARS-CoV-2 resembles the sugar transporter SemiSWEET. Pathog Immun. 2020; 5(1):342–363.
- [7] Shang J, Wan Y Luo C i in. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci USA. 2020; 26;117(21):11727-11734.
- [8] Xiang F, Wang X, He X i in. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019. Clin Infect Dis. 2020;71(8):1930-1934.
- [9] Gómez-Rial J, Rivero-Calle I, Salas A i in. Role of Monocytes/Macrophages in Covid-19 Pathogenesis: Implications for Therapy. Infection and Drug Resistance. 2020; 13: 2485–2493.
- [10] Nitin P, Nandhakumar R, Vidhya B i in. COVID-19: Invasion, pathogenesis and possible cure – a review. J Virol Methods. 2022; 300:114434.
- [11] CDC (2022). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html#print> [Dostęp: 26.10.2022]
- [12] Flisiak R., Rzymiski P, Zarębska-Michaluk D i in. Demographic and clinical overview of hospitalized COVID-19 patients during the first 17 months of the pandemic in Poland. J Clin Med. 2022; 11:117.
- [13] Sanche S, Lin YT, Xu i in. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Emerg Infect Dis. 2020; 26:1470–1477.

- [14] Jansen L, Tegomoh B, Lange K i in. Investigation of a SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant Cluster – Nebraska, November–December 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021; 70:1782–1784.
- [15] Liu Y, Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J Travel Med.* 2021; 28.
- [16] CDC: Omicron variant: what you need to know. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/omicron-variant.html> [Dostęp: 20.02.2022].
- [17] Garrett N, Tapley A, Andriesen J i in. High rate of asymptomatic carriage associated with variant strain Omicron. *medRxiv.* 2021; 2021.12.20.21 268130.
- [18] Ferguson N, Ghani A, Cori A i in. Report 49: Growth, population distribution and immune escape of Omicron in England. Imperial College London, <https://www.imperial.ac.uk/mrc-global-infectious-disease-analysis/covid-19/report-49-Omicron> [Dostęp: 20.02.2022]
- [19] Tshwane district omicron variant patient profile-early features. <https://www.samrc.ac.za/news/tshwane-district-omicron-variant-patient-profile-early-features> [Dostęp: 20.02.2022]
- [20] Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng A i in. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA.* 2020; 324: 782–79.
- [21] CDC COVID-19 Response Team. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant - United States, December 1-8, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021; 17;70(50):1731-1734.
- [22] Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV i in. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J.* 2020; 96: 753–758.
- [23] Long B, Carius BM, Chavez S i in. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. *Am J Emerg Med.* 2022; 54: 46–57.
- [24] Mao L, Jin H, Wang M i in. Neurological manifestation of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77: 683–690.
- [25] Helms J, Kremer S, Merdji H i in. Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection. *N Engl J Med.* 2020; 382: 2268–2270.
- [26] Taquet M, Geddes JR, Husain M i in. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry.* 2021; 8: 416–427.

- [27] Rajpal S, Tong MS, Borchers J i in. Cardiovascular magnetic resonance findings in competitive athletes recovering from COVID-19 infection. *JAMA Cardiol.* 2021; 6: 116–118.
- [28] Kaafarani HM, El Moheb M, Hwabejire JO i in. Gastrointestinal complications in critically ill patients with COVID-19. *Ann Surg.* 2020; 272: e61–e62.
- [29] Rawson TM., Moore LS, Zhu N i in. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin Infect Dis.* 2020; 3;71(9):2459–2468.
- [30] Kim D, Quinn J, Pinsky B i in. Rates of co-infection between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA.* 2020; 323(20):2085–2086.
- [31] Green K, Winter A, Dickinson R i in. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages? The Centre for Evidence-Based Medicine, <https://www.cebm.net/covid-19/what-tests-could-potentially-be-used-for-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19-and-what-are-their-advantages-and-disadvantages/> [Dostęp: 20.04.2020]
- [32] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1:1559–1582.
- [33] Lee MS, Chang PC, Shien JH. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2001 doi: 10.1016/S0166-0934(01)00301-9.
- [34] Rao A, Goldstein DY, Wolk DM. Development and Evaluation of Two SARS-CoV-2 RT-PCR Laboratory Developed Tests on the ARIES ® Automated, Sample-To-Answer, Real-Time PCR System. 2020. <https://www.luminexcorp.com>.
- [35] Diao B, Wen K, Chen J i in. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. *medRxiv.* 2020; 3.7.20032524.
- [36] Yüce M, Filiztekin E, Ozkaya KG. COVID-19 diagnosis — A review of current methods. *J Bios* 2021; 0956-5663.
- [37] Burton DR. Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15(2):64-9.
- [38] Jacofsky D, Jacofsky E, Officer C i in. Understanding antibody testing for COVID-19. *J Arthroplasty.* 2020 doi: 10.1016/j.arth.2020.04.055.
- [39] Loeffelholz M, Tang Y. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections. *Emerg Microb Infect.* 2020; 9:747–756.

- [40] Soh J, Chan H, Ying J. Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. *Nano Today*. 2020; 30
- [41] Okba N, Muller M, Li W i in. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *Emerg Infect Dis*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.18.20038059. 03.18.20038059.
- [42] Cevik M, Bamford C, Ho A. COVID-19 pandemic – a focused review for clinicians. *Clin Microbiol Infect*. 2020 doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.023.
- [43] Li Z, Yi Y, Luo X i in. Development and clinical application of A Rapid IgM-IgG combined antibody Test for SARS-CoV-2 infection Diagnosis. *J Med Virol*. 2020 doi: 10.1002/jmv.25727. 0–1.
- [44] Woo CH, Jang S, Shin G i in. Sensitive One-step Isothermal Detection of Pathogen-derived RNAs. *medRxiv*. 2020; 03.05.20031971
- [45] Kent C. Different Paths to the Same Destination : Screening for Covid-19. 2020. [www Document].
- [46] Kundu D, Gautam P, Dayanand D i in. The role and diagnostic accuracy of serology for COVID-19. *BMC Infect Dis* 2022; 22, 390.
- [47] Lei Y, Zhang HW, Yu J i in. COVID-19 Infection: Early Lessons. *Can Assoc Radiol J*. 2020; (Epub ahead of print), doi.org/https://doi.org/10.1177/0846537120914428
- [48] Rubin GD, Haramati LB, Kanne JP i in. The Role of Chest Imaging in Patient Management during the COVID-19 Pandemic: A Multinational Consensus Statement from the Fleischner Society. *Radiology*. 2020 <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.003>.
- [49] Rousan LA, Elobeid E, Karrar M, i in. Chest x-ray findings and temporal lung changes in patients with COVID-19 pneumonia. *BMC Pulm*. 2020; 20, 245.
- [50] Pan Y, Guan H, Zhou S i in. Initial CT findings and temporal changes in patients with the novel coronavirus pneumonia (2019-nCoV): a study of 63 patients in Wuhan, China. *European radiology*. 2020; 30, 3306-3309.
- [51] Xun Ding, Jia Xu, Jun Zhou i in. Chest CT findings of COVID-19 pneumonia by duration of symptoms. *European Journal of Radiology*. 2020; 127,109009.
- [52] Li L, Qin L, Xu Z i in. Using Artificial Intelligence to Detect COVID-19 and Community-acquired Pneumonia Based on Pulmonary CT: Evaluation of the Diagnostic Accuracy. *Radiology*. 2020; 296(2):E65-E71.
- [53] Ferrari D, Motta A, Strollo M i in. "Routine blood tests as a potential diagnostic tool for COVID-19" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020; 58;7;1095-1099.

- [54] Zhang C, Wu Z, Li JW i in. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020; 55(5):105954.
- [55] Lagevrio – Summary of Product Characteristics. <https://www.gov.uk/government/publications/regulatory-approval-of-lagevrio-molnupiravir/summary-of-product-characteristics-for-lagevrio> [Dostęp: 20.02.2022].
- [56] Veklury – charakterystyka produktu leczniczego. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/veklury-epar-product-information_pl.pdf [Dostęp: 20.02.2022].
- [57] Ramakrishnan S, Nicolau DV, Langford B i in.: Inhaled budesonide in the treatment of early COVID-19 (STOIC): a phase 2, open-label, randomised controlled trial [published correction appears in *Lancet Respir Med*. 2021; 9: 763–772.
- [58] Horby P, Lim WS, Emberson JR i in. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384: 693–704.
- [59] Ayerbe L, Risco C, Ayis S. The association between treatment with heparin and survival in patients with Covid-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 50: 298–301.
- [60] Tang N, Bai H, Chen X i in. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2020; 18: 1094–1099.
- [61] Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE i in. Remdesivir for the treatment of Covid-19 – final report. *N Engl J Med*. 2020; 383: 1813–1826.
- [62] Paxlovid – Summary of Product Characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/paxlovid-epar-product-information_pl.pdf [Dostęp 20.02.2022].
- [63] Tomasiewicz K, Piekarska A, Stempkowska-Rejek J i in. Tocilizumab for patients with severe COVID-19: a retrospective, multi-center study. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021; 19: 93–100.
- [64] Flisiak R, Jaroszewicz J, Rogalska M i in. Tocilizumab improves the prognosis of COVID-19 in patients with high IL-6. *J Clin Med*. 2021; 10: 1583.
- [65] Zarębska-Michaluk D, Jaroszewicz J, Rogalska M i in. Effectiveness of tocilizumab with and without dexamethasone in patients with severe COVID-19: a retrospective study. *J Inflamm Res*. 2021; 14: 3359–3366.

- [66] Granholm A, Munch MW, Myatra SN i in. Dexamethasone 12 mg versus 6 mg for patients with COVID-19 and severe hypoxaemia: a pre-planned, secondary Bayesian analysis of the COVID STEROID 2 trial. *Intensive Care Med.* 2022; 48: 45–55.
- [67] Wujtewicz MA, Dylczyk-Sommer A, Aszkiełowicz A i in. COVID-19 – what should anaesthesiologists and intensivists know about it? *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2020; 52: 34–41.
- [68] Flisiak R: Śmiertelność z powodu COVID-19, dane z bazy SARSTer. <http://www.pteilchz.org.pl/wpcontent/uploads/2021/01/%C5%9Bmiertelno%C5%9B%C4%87-w-Polsce-26-01-2021.pdf> [Dostęp: 20.02.2022].
- [69] Dennis A, Wamil M, Alberts J i in. COVERSCAN study investigators. Multiorgan impairment in low risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open.* 2021;11(3):e048391.
- [70] Del Rio C, Collins LF, Malani P. Long-term Health Consequences of COVID-19. *JAMA.* 2020;324(17):1723-1724.
- [71] Filipiak KJ. Zespoły post-COVID oraz long- COVID – próba systematyzacji. W: Pacjent post-COVID-owy, co zostaje, a co się zmienia? Materiały ogólnopolskiej konferencji hybrydowej NIGRiR, Warszawa 2021; ISBN 978 83-956149-3- 4:31-36, 43-45.
- [72] Altmann DM, Whettlock EM, Liu S i in. 2023. "The immunology of long COVID". *Nature Reviews. Immunology.* 2023; (10): 618–634.
- [73] Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond).* 2021; 53(10):737- 754.
- [74] Silva Andrade B, Siqueira S, de Assis Soares WR, i in. Long-COVID and Post-COVID Health Complications: An Up-to-Date Review on Clinical Conditions and Their Possible Molecular Mechanisms. *Viruses.* 2021; 13(4):700.
- [75] McDonald LT. Healing after COVID-19: are survivors at risk for pulmonary fibrosis? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2021; 320(2): 257-265.
- [76] Huang C, Wang Y, Li X i in. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223):497-506.
- [77] Harapan BN, Yoo HJ. Neurological symptoms, manifestations, and complications associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19). *J Neurol.* 2021; 268(9):3059-3071.
- [78] Asadi-Pooya AA, Akbari A, Emami A, i in. Long COVID syndrome-associated brain fog. *J Med Virol.* 2021;21:10.1002/jmv.27404.

- [79] Soheili M, Khateri S, Moradpour F i in. The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2023;22,42.
- [80] Euroimmun blog (2022). <https://euroimmun.pl/blog/euroline-anty-sars-cov-2-profil-igg-test-do-zadan-specjalnych> [Dostęp: 28.03.2022].
- [81] Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020; 20(5):453–454.
- [82] Macedo ACL, Prestes GDS, Colonetti T i in. A systematic review and meta-analysis of the accuracy of SARS-COV-2 IGM and IGG tests in individuals with COVID-19. *J Clin Virol.* 2022; 148:105121.
- [83] Mallano A, Ascione A, Flego M. Antibody Response against SARS-CoV-2 Infection: Implications for Diagnosis, Treatment and Vaccine Development. *Int Rev Immunol.* 2022; 41(4):393-413.
- [84] Wang Y, Kang H, Liu X i.in. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol.* 2020; (92):538-539.
- [85] Huang Y, Cheng W, Zhao N i in. CT screening for early diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(9):1010-1011.
- [86] Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y i in. Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 6:233-234.
- [87] Colgrove R, Bruno-Murtha LA, Chastain CA i in. Tale of the Titers: Serologic Testing for SARS-CoV-2-Yes, No, and Maybe, With Clinical Examples From the IDSA Diagnostics Committee. *Open Forum Infect Dis.* 2022; 10(1):674.
- [88] Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK i in. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2020; 370:m2516.
- [89] Li C, Zhao C, Bao J i in. Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clin Chim Acta (2020)* (510):34-47
- [90] Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF i in. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol.* 2020; (154):292-305.
- [91] Beavis KG, Matushek SM, Abeleda APF i in. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J Clin Virol.* 2020; 129:104468.

- [92] Rajpal VR, Sharma S, Kumar A i in. "Is Omicron mild"? Testing this narrative with the mutational landscape of its three lineages and response to existing vaccines and therapeutic antibodies. *J Med Virol.* 2022; 94(8):3521-3539.
- [93] Alhamid G, Tombuloglu H, Rabaan, AA i in. SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review. *Saudi J Biol Sci.* 2022; 29(11):103465.
- [94] Heskin J, Pallett S, Al Hindawi A i in. Evaluating the performance characteristics of five lateral flow assays for the detection of the SARS CoV 2 nucleocapsid antigen. *Sci Rep.* 2022; (12):8811.
- [95] Nicol T, Lefeuvre C, Serri O i in. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol.* 2020; (129):104511.
- [96] Luz M, Teixeira da Silva Júnior R, Santos de Santana G i in. Molecular and serology methods in the diagnosis of COVID-19: An overview, *World J Methodol.* 2022; 12(3):83-91.
- [97] Dandan L, Jinming L. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. *J Clin Microbiol.* 2021; 59(5):e02160-20.
- [98] Zheng X, Duan RH, Gong F i in. Accuracy of serological tests for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Front Public Health.* 2022; 10:923525.
- [99] Dowlatshahi S, Shabani E, Abdekhodaie M. Serological assays and host antibody detection in coronavirus related disease diagnosis. *Arch Virol.* 2021; 166:715–731.
- [100] Emeribe AU, Abdullahi IN, Shuwa HA i in. Humoral immunological kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection and diagnostic performance of serological assays for coronavirus disease 2019: an analysis of global reports. *Int Health.* 2022; 14(1):18-52.
- [101] Guo J, Ge J, Guo Y. Recent advances in methods for the diagnosis of Corona Virus Disease 2019. *J Clin Lab Anal.* 2022; 36(1):e24178.
- [102] Muecksch F, Wise, H, Batchelor B i in. Longitudinal serological analysis and neutralizing antibody levels in coronavirus disease 2019 convalescent patients. *J Infect Dis.* 2021; 223(3):388–398.
- [103] Lu Y, Sun Z. SARS-CoV-2 Molecular Diagnostics in China. *Clin Lab Med.* 2022; 42(2):193-201.

- [104] Chong YP, Choy KW, Doerig C i in. SARS-CoV-2 Testing Strategies in the Diagnosis and Management of COVID-19 Patients in Low-Income Countries: A Scoping Review. *Mol Diagn Ther.* 2023; 1-18.
- [105] Entesari M, Zamani M, Heidarizadeh M i in. An Insight Into Detection Pathways/Biosensors of Highly Infectious Coronaviruses. *Mol Biotechnol.* 2022; 64(4):339-354.
- [106] Høeg TB, Prasad V. Rapid antigen testing for COVID-19: Decreasing diagnostic reliability, potential detrimental effects and a lack of evidence to support continued public funding of community-based testing. *Public Health Pract (Oxf).* 2023; 23;6:100451
- [107] Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F i in. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 2020; 584(7821):437–442.
- [108] Gazit S, Shlezinger R, Perez G i in. Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections. *MedRxiv.* 2021; 08.24.212-215.
- [109] Wajnberg A, Amanat F, Firpo A i in. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science.* 2020; 370(6521):1227-30.
- [110] Yang Y, Du L. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6(1):95.
- [111] Pang NYL, Pang ASR, Chow VT i in. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Military Med Res* 2021; 8, 47.
- [112] Azami M, Moradi Y, Moradkhani A i in. SARS-CoV-2 seroprevalence around the world: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res.* 2022; 27(1):81.
- [113] Lu Y, Wang J, Li Q, i in. Advances in Neutralization Assays for SARS-CoV-2. *Scandinavian Journal of Immunology* (2021) 94(3), e13088.
- [114] Fafi- Kremer S, Bruel T, Madec Y i in. Serologic responses to SARS- CoV- 2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine.* 2020; 59:102915.
- [115] Ni L, Ye F, Cheng ML i in. Detection of SARS- CoV- 2- specific humoral and cellular immunity in COVID- 19 convalescent individuals. *Immunity.* 2020; 52(6), 971- 977.
- [116] Prévost J, Gasser R, Beaudoin-Bussièrès G i in. Cross-sectional evaluation of humoral responses against SARS-CoV-2 spike. *Cell Rep Med.* 2020; 1(7), 100-126.
- [117] Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022; 186-187.

- [118] Xianyong W, Qiming Ch, Junhai L i in. Diagnostic techniques for COVID-19: A mini-review. *J Virol Methods*. 2022; 301:114437.
- [119] Ciniselli CM, Lecchi M, Figini M i in. COVID-19 Vaccination in Health Care Workers in Italy: A Literature Review and a Report from a Comprehensive Cancer Center. *Vaccines*. 2022; 10(5):734.
- [120] Lohiya DV, Pathak SS. Role of Technology in Detection of COVID-19. *Cureus*. 2022; 14(9): e29138.
- [121] Nair S, Chen X. Biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the humoral immunoresponse: a systematic review of evidence to support global policy-level actions and research. *Glob Health J*. 2022; 6(1):38-43
- [122] Smerczak E. SARS-CoV-2 Antibody Testing: Where Are We Now?. *Lab Med*. 2022; 53(2):e19-e29.
- [123] Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji (2021). <https://www.aotm.gov.pl/media/2021/05/Diagnostyka-COVID-19---Aktualizacja-Zalecen-wersja-2.1-27-maja-2021-r.pdf> [Dostęp: 27.05.2021]
- [124] Zhu Y, Yu D, Han Y i in. Crossreactive neutralization of SARS-CoV-2 by serum antibodies from recovered SARS patients and immunized animals. *Sci Adv*. 2020; 6(45):eabc9999.
- [125] Lv H, Wu N, Tsang O i in. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *Cell Re*. 2020; (31):107725.
- [126] Gruell H, Vanshylla K, Weber T. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. *Immunity*. 2022; 55(6):925-944.
- [127] Ebinger J, Fert-Bober J, Printsev I i in. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2, *Nat Med*. 2021; 27(6):981–984.
- [128] Rashedi R, Samieefar N, Masoumi N i in. COVID-19 vaccines mix-and-match: The concept, the efficacy and the doubts. *J Med Virol*. 2022; 94(4),1294-1299.
- [129] Devi MJ, Gaffar S, Hartati YW. A review post-vaccination SARS-CoV-2 serological test: Method and antibody titer response. *Anal Biochem*. 2022; 658:114902.
- [130] To KK, Sridhar S, Chiu, KH i in. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect*. 2021; 10(1):507-535.
- [131] Yang Y, Yang M, Peng Y i in. Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection. *Nat Microbiol*. 2022; 7, 423–433.

- [132] Cavanna L, Citterio C, Toscani I. COVID-19 Vaccines in Cancer Patients. Seropositivity and Safety. Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines*. 2021 (9):1048.
- [133] Thee S. Performance Characteristics of High -Throughput Serologic Assays for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 with Food and Drug Administration Emergency Use Authorization: A Review. *Clin Lab Med*. 2022; 42(1):15-29.
- [134] Nerenz RD, Hubbard JA, Cervinski MA. Review of SARS-CoV-2 Antigen and Antibody Testing in Diagnosis and Community Surveillance. *Clin Lab Med*. 2022; 42(4):687-704.
- [135] Safari I, Elahi E. Evolution of the SARS-CoV-2 genome and emergence of variants of concern. *Arch Virol* (2022) 167(2):293-305.
- [136] Castro Dopico X, Ols S, Loré K i in. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med* (2022) 291(1):32-50.
- [137] Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: What Do We Know and Should We Be Testing for It?. *J Clin Microbiol*. 2022; 60(6):e0048221.
- [138] Sakuraba A, Luna A, Micic D i in. Serologic response following SARS-COV2 vaccination in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Hematol Oncol*. 2022; 15:15.
- [139] Desai A, Gainor JF, Hegde A i in. COVID-19 vaccine guidance for patients with cancer participating in oncology clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021; 18(5):313–9.
- [140] Riccardi N, Falcone M, Yahav D. Vaccination for SARS-CoV-2 in Hematological Patients. *Acta Haematol*. 2022; 145(3):257-266.
- [141] Soetedjo NNM, Iryaningrum MR, Lawrensia S i in. Antibody response following SARS-CoV-2 vaccination among patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetes Metab Syndr*. 2022; 16(2):102406.
- [142] Parker EPK, Desai S, Marti M i in. Response to additional COVID-19 vaccine doses in people who are immuno-compromised: a rapid review. *Lancet Glob Health*. 2022; 10(3), 326-328.
- [143] Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020; 215-248.
- [144] Cortés-Sarabia K, Gutiérrez-Torres M, Mendoza-Renteria EM, i in. Variation in the Humoral Immune Response Induced by the Administration of the BNT162b2 Pfizer/BioNTech Vaccine: A Systematic Review. *Vaccines*. 2022; 10(6):909.

- [145] Mohanty S, Garcia U, MacDonald B i in. Coronavirus Disease-19 Testing Strategies for Patients and Health Care Workers to Improve Workplace Safety. *Card Electrophysiol Clin.* 2022; 14(1):111-114.
- [146] <https://bialystok.plus/uczestnicy/> [Dostęp: 04.04.2019].
- [147] <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/poland/> [Dostęp: 23.01.2023].
- [148] Centers for Disease Control. 2022. <https://www.cdc.gov/> [Dostęp: 23.02.2022].
- [149] Terpos E, Trougakos IP, Apostolakou F i in. Age-dependent and gender-dependent antibody responses against SARS-CoV-2 in health workers and octogenarians after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine. *Am J Hematol.* 2021; 96:E257–9.
- [150] Amorim FL, Szwarcwald CL, Mateos SO i in. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saude Publica.* 2020; 54:69.
- [151] Gallian P, Pastorino B, Morel P i in. Lower prevalence of antibodies neutralizing SARS-CoV-2 in group O French blood donors. *Antiviral Res.* 2020; 181:104880.
- [152] Lai CC, Wang JH, Hsueh PR. Population-based seroprevalence surveys of anti-SARS-CoV-2 antibody: An up to-date review. *International Journal of Infectious Diseases* 2020; 101:314–22.
- [153] Havers FP, Reed C, Lim T i in. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV- 2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, *JAMA Intern Med.* 2020; 180:1776–86.
- [154] Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021; 397:72–74.
- [155] Paltiel AD, Schwartz JL, Zheng A i in. Clinical outcomes of a COVID-19 vaccine: implementation Over Efficacy. *Health Aff.* 2021; 40:42–52.
- [156] Zhang Y, Zeng G, Pan H i in. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21:181–192.
- [157] Bartsch SM, O'Shea KJ, Ferguson MC i in. Vaccine efficacy needed for a COVID-19 coronavirus vaccine to prevent or stop an epidemic as the sole intervention. *Am J Prev Med.* 2020; 59:493–503.
- [158] Lin DY, Zeng D, Mehrotra DV i in. Evaluating the Efficacy of Coronavirus Disease 2019 Vaccines. *Clin Infect Dis.* 2021; 73:1540–1544.
- [159] Shaw J, Stewart T, Anderson KB i in. Assessment of US Healthcare personnel attitudes towards coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccination in a large University Healthcare System. *Clin Infect Dis* 73:1776–1783.

- [160] Hägg S, Religa D. COVID vaccination in older adults. *Nat Microbiol.* 2022; 7:1106–7.
- [161] Notarte K, Catahay J, Peligro P i in. Humoral Response in Hemodialysis Patients Post-SARS-CoV-2 mRNA Vaccination: A Systematic Review of Literature. *Vaccines.* 2023; 11(4), 724.
- [162] Chen G, Wu D, Guo W i in. 2020. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease. *J Clin Invest.* 2019; 130:2620–2629.
- [163] Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C i in. Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 in patients with Coronavirus disease 2019. *J Infect Dis.* 2020; 222:206–213.
- [164] Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC i in. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. *Cell Rep Med.* 2020; 1:100040.
- [165] Seydoux E, Homad LJ, MacCamy AJ i in. Analysis of a SARS-CoV-2-infected individual reveals development of potent neutralizing antibodies with limited somatic mutation. *Immunity.* 2020; 53:98–105.
- [166] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA i in. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020; 181:281–292.
- [167] Choe PG, Kim KH, Kang CK i in. Antibody responses 8 months after asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27:928–931.
- [168] Trougakos IP, Terpos E, Zirou C i in. Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients. *BMC Med.* 2021; 19:208.
- [169] Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM i in. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 22:eabf8891.
- [170] Röltgen K, Powell AE, Wirz OF i in. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol.* 2020; 5.
- [171] Shrivastava S, Palkar S, Shah J i in. Early and high SARS-CoV-2 neutralizing antibodies are associated with severity in COVID-19 patients from India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2021; 105:401–6.
- [172] Chen W, Zhang J, Qin X i in. SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels are correlated with severity of COVID-19 pneumonia. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2020; 130.

- [173] Schlickeiser S, Schwarz T, Steiner S i in. Disease Severity, Fever, Age, and Sex Correlate With SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses. *Front Immunol.* 2021; 11.
- [174] Trinité B, Tarrés-Freixas F, Rodon J i in. SARS-CoV-2 infection elicits a rapid neutralizing antibody response that correlates with disease severity. *Sci Rep.* 2021; 11.
- [175] Wang P, Liu L, Nair MS i in. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9:2091–3.
- [176] Kurano M, Ohmiya H, Kishi Y i in. Measurement of SARS-CoV-2 Antibody Titers Improves the Prediction Accuracy of COVID-19 Maximum Severity by Machine Learning in Non-Vaccinated Patients. *Front Immunol.* 2022; 13.
- [177] Long QX, Tang XJ, Shi QL i in. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020; 26,1200–1204.
- [178] Chen X, Pan Z, Yue S i in. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5, 180.
- [179] National Institute of Public Health PZH-National Research Institute. <https://covar.mi2.ai/poland/voc>. [Dostęp: 21.02.2022].
- [180] Kang S, Yang M, He S i in. A SARS-CoV-2 antibody curbs viral nucleocapsid protein-induced complement hyperactivation. *Nat Commun.* 2021;12(1):2697.
- [181] Bergeri I, Whelan MG, Ware H i in. Global SARS-CoV-2 seroprevalence from January 2020 to April 2022: A systematic review and meta-analysis of standardized population-based studies. *PLoS Med.* 2022; 19:e1004107.
- [182] Castilla J, Lecea Ó, Salas CM i in. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 and risk of COVID-19 in Navarre, Spain, May to July 2022. *Eurosurveillance* 2022; 27.
- [183] Ren Z, Nishimura M, Tjan LH i in. Large-scale serosurveillance of COVID- 19 in Japan: Acquisition of neutralizing antibodies for Delta but not for Omicron and requirement of booster vaccination to overcome the Omicron’s outbreak. *PLoS One.* 2022; 17.
- [184] Kleynhans J, Tempia S, Wolter N i in. SARS-CoV-2 Seroprevalence after Third Wave of Infections, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2022; 28:1055–8.
- [185] Wang Y, Zheng K, Gao W i in. Asymptomatic and pre-symptomatic infection in Coronavirus Disease 2019 pandemic. *Medical Review.* 2022; 2:66–88.
- [186] Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B i in. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19:409–24.

- [187] He P, Liu B, Gao X i in. SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants evade population antibody response by mutations in a single spike epitope. *Nat Microbiol* 2022; 7:1635–49.
- [188] Assis R, Jain A, Nakajima R i in. Distinct SARS-CoV-2 antibody reactivity patterns elicited by natural infection and mRNA vaccination. *NPJ Vaccines*. 2021 (6):132.
- [189] Selva KJ, van de Sandt CE, Lemke MM i in. Systems serology detects functionally distinct coronavirus antibody features in children and elderly. *Nat Commun*. 2021; 12:1–14.
- [190] Wang EY, Mao T, Klein J i in. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature*. 2021; 595:283–8.
- [191] Okrzeja J, Garkowski A, Kubas B i in. Imaging and neuropathological findings in patients with Post COVID-19 Neurological Syndrome-A review. *Frontiers in neurology*. 2023; 14: 1136348.
- [192] Neopane P, Nypaver J, Shrestha R i in. Performance Evaluation of TaqMan SARS-CoV-2, Flu A/B, RSV RT-PCR Multiplex Assay for the Detection of Respiratory Viruses. *Infect Drug Resist*. 2022; 15:5411-5423.
- [193] Areerob Y, Sagadevan S, Oh WC. A comprehensive review and clinical guide to molecular and serological diagnostic tests and future development: In vitro diagnostic testing for COVID-19. *Nanotechnol Rev*. 2023; 12:2022-0513.
- [194] Rogier EW, Giorgi E, Tetteh K i in. Current research on serological analyses of infectious diseases. *Front Med*. 2023; 10:2023-1154584.