



***Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych***

DZIEDZINA: NAUKI MEDYCZNE I NAUKI O ZDROWIU

DYSCYPLINA: NAUKI MEDYCZNE

Autor: lek. Joanna Kulikowska-Łoś

**Analiza przeciwciał przeciwko białkom N i S wirusa SARS-CoV-2 u pacjentów  
ze stwardnieniem rozsianym leczonych lekami modyfikującymi przebieg choroby**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Alina Kułakowska

Klinika Neurologii

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok, 2024



***Doctoral Thesis***

FIELD OF SCIENCE: MEDICINE AND HEALTH SCIENCE

SCIENTIFIC DISCIPLINE: MEDICINE

Author: Joanna Kulikowska-Łoś

**Analysis of antibodies against N and S protein of SARS-CoV-2 in patients  
with multiple sclerosis treated with disease modifying therapies**

First supervisor: Prof. dr hab. n. med. Alina Kułakowska

Department of Neurology

Head of Department: Prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz

Medical University of Białystok

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School  
of Medical University of Białystok

Białystok, 2024

Pragnę podziękować Pani Profesor Alinie Kułakowskiej za nieocenione wsparcie  
i wprowadzenie do pasjonującego świata nauki.

Dziękuję Kierownictwu Kliniki Neurologii UMB, Koleżankom i Kolegom z Kliniki,  
a w szczególności opiekunowi specjalizacji, bez pomocy  
i wyrozumiałości których, ta praca by nie powstała.

Dziękuję Szkole Doktorskiej i Uniwersytetowi Medycznemu w Białymstoku  
za umożliwienie rozwoju naukowego.

Dziękuję również Rodzinie i Mężowi, których wsparcie i obecność towarzyszy mi  
w każdej chwili mojego życia.

Praca została sfinansowana przez:

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach zadań badawczych o numerze:

SUB/1/DN/21/002/1144

SUB/1/DN/22/001/1144

## Spis treści

1. Życiorys .....	6
2. Zestawienie publikacji .....	9
3. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej .....	10
4. Wykaz stosowanych skrótów .....	11
5. Wstęp .....	13
5.1 Wirus SARS-CoV-2 .....	13
5.2 Stwardnienie rozsiane .....	16
6. Cel pracy doktorskiej .....	20
7. Metodologia .....	20
7.1 Analiza dostępnego piśmiennictwa .....	20
7.2 Badania własne .....	20
7.2.1 Grupa badana oraz harmonogram przeprowadzonych badań .....	20
7.3 Analiza laboratoryjna .....	22
8. Analiza statystyczna .....	23
9. Wyniki .....	24
9.1 Wyniki I etapu badań: analiza obecności przeciwciał przeciwko białkom N i S wirusa SARS-CoV-2 .....	24
9.2 Wyniki II etapu badań: analiza poziomów przeciwciał przeciwko domenie wiążącej receptor białka S1 (S1-RBD) i przeciwciał przeciwko białku N. ....	26
9.2.1. Analiza przeciwciał IgG- S1RBD .....	26
9.2.2 Analiza przeciwciał IgG-N .....	28
10. Wnioski .....	30
11. Publikacja 1. ....	31
12. Publikacja 2. ....	47
13. Publikacja 3. ....	57
14. Streszczenie w języku polskim .....	69
15. Streszczenie w języku angielskim .....	73
16. Piśmiennictwo .....	76
17. Zgoda Komisji Bioetycznej .....	85
18. Oświadczenia współautorów .....	86

## **1. Życiorys**

Imię i nazwisko: Joanna Kulikowska-Łoś

Data i miejsce urodzenia: 19.08.1994, Białystok

Tytuł zawodowy: Lekarz

### **Wykształcenie:**

2020-2024 – Szkoła Doktorska; Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2013-2019 – Kierunek Lekarski; Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### **Doświadczenie zawodowe:**

Od 2020 – Lekarz rezydent; Klinika Neurologii; Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

2019 – 2020 – Lekarz stażysta, Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

### **Praktyki i staże zagraniczne:**

2018r – Klinika Neurochirurgii; Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Rechts der Isaar; Monachium, Niemcy (staż miesięczny)

2015r – Klinika Ortopedii i Traumatologii; Uniwersytecki Szpital Kliniczny Costa del Sol, Hiszpania (staż miesięczny)

### **Kursy zawodowe:**

2024 – Szkolenie z zakresu EEG dzieci i młodzieży; Klinika Neurologii wieku rozwojowego, Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Poznaniu (staż uzupełniający szkolenie EEG dorosłych: 2 tygodnie)

2023/2024 - Basic EEG course; International League against Epilepsy (kurs 6-miesięcy)

2023 – Szkolenie z zakresu EEG dorosłych; Zakład Neurofizjologii Klinicznej; Instytut Neurologii i Psychiatrii w Warszawie (staż 3 miesiącz

## Konferencje polskie i zagraniczne (udział aktywny)

- 10th Congress of the European Academy of Neurology. Helsinki, Finland, 22 June-02 July 2024; Analysis of IgG antibodies against S1-RBD of SARS-CoV2 in patients with MS treated with DMT in North-Eastern Poland (plakat).
- VI Konferencja Sekcji SM i Neuroimmunologii PTN –sesja najlepszych prac opublikowanych w 2023r; „Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies" (prezentacja ustna).
- MSMilan2023 9thECTRIMS-ECTRIMS Meeting; 11 – 13 October Milan, Italy; Analysis of IgG antibodies against SARS-CoV-2 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, treated with first-line disease modifying therapies (poster).
- 8th Congress of the European Academy of Neurology. Vienna, Austria, June 25-28, 2022; Antibodies against SARS-CoV-2 in patients with relapsing remitting MS treated with disease modifying therapies (plakat).
- 8th Congress of the European Academy of Neurology. Vienna, Austria, June 25-28, 2022; Safety of vaccines against SARS-CoV-2 among patients with multiple sclerosis treated with disease modifying therapies (prezentacja ustna).
- VII Konferencja naukowo-szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Neurologicznego. Lublin 14-17 września 2022. Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SARS-CoV-2 u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego leczonych lekami modyfikującymi przebieg choroby (plakat).
- VII Konferencja naukowo-szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Neurologicznego. Lublin 14-17 września 2022; Mutacja w genie *ERCC4* jako rzadka przyczyna ataksji mózdkowej - opis przypadku (plakat)
- 13th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists. Białystok, 17-19th May 2018; Characteristics of patients diagnosed with ischemic and hemorrhagic stroke, hospitalized in the Department of Neurology, Medical University of Białystok (Poland) in 2016.

- 13th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists. Białystok, 17-19th May 2018; Carrier of X-linked adrenoleukodystrophy a rare imitation of multiple sclerosis clinical aspects and the importance of differential diagnosis (prezentacja ustna).
- I Ogólnopolska Studencka Konferencja Neurologiczna, Olsztyn, 11 listopada 2017; Obustronny udar niedokrwienny wzgórza - opis przypadku (prezentacja ustna)



## 2. Zestawienie publikacji

<b>Rodzaj publikacji</b>	<b>Liczba</b>	<b>IF wg JCE na rok publikacji</b>	<b>Punktacja MEiN</b>
Prace przeglądowe włączone do rozprawy	1	6,2	140
Prace oryginalne włączone do rozprawy	2	10,7	280
Prace oryginalne niewłączone do rozprawy	5	14,1	380
Opisy przypadków i prace przeglądowe niewłączone do rozprawy	4	9,13	390
<b>Razem</b>	<b>12</b>	<b>40,13</b>	<b>1190</b>

### 3. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Nazwa czasopisma	Tytuł artykułu	IF wg JCE na rok publikacji	Punkcja MEiN	Data publikacji	Rodzaj publikacji
<i>International Journal of Medical Science</i>	The significance of COVID-19 immunological status in severe neurological complications and multiple sclerosis - a literature review	6,2	140	31.05.2021	Praca przeglądowa
<i>Neurologia i Neurochirurgia Polska</i>	Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies	2,9	140	24.11.2022	Praca oryginalna
<i>Vaccines</i>	Analysis of the presence and levels of IgG antibodies directed against the S1 protein receptor binding domain and the N protein of SARS-CoV-2 in patients with multiple sclerosis treated with immunomodulatory therapies	7,8	140	29.02.2024	Praca oryginalna

#### 4. Wykaz stosowanych skrótów

ARDS – *Acute respiratory distress syndrome*; zespół ostrej niewydolności oddechowej

BBB – *Blood-brain barrier*; bariera krew-mózg

Białko E – *Envelope protein*; białko otoczki

Białko M – *Membrane protein*; białko błonowe

Białko N – *Nucleocapsid protein*; białko nukleokapsydu

Białko S – *Spike protein*; białko kolca

COVID-19 – *Coronavirus disease 2019*; choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusa SARS-CoV-2

DMF – *Dimethyle fumarate*; fumaran dimetylu

DMT – *Disease modifying therapies*; leki modyfikujące przebieg choroby

EDSS – *Expanded Disability Status Scale*; Rozszerzona Skala Niepełnosprawności

FDA – *Food and Drug Administration*; Agencja Żywności i Leków

GA – *Glatiramere acetate*; octan glatitrameru

IgA – Immunoglobulina A

IgA-S – Przeciwciała w klasie IgA przeciwko białku kolcawirusa SARS-CoV-2

IgG – Immunoglobulina G

IgG-N – Przeciwciała w klasie IgG przeciwko białku nukleokapsydu wirusa SARS-CoV-2

IgG-S – Przeciwciała w klasie IgG przeciwko białku kolca wirusa SARS-CoV-2

NFZ – Narodowy Fundusz Zdrowia

IgG-S1RBD – Przeciwciała w klasie IgG skierowane przeciwko domenie wiążącej receptor podjednostki 1 białka kolca wirusa SARS-CoV-2

IgM – Immunoglobulina M

INF  $\beta$  – *Interferon beta*; interferon beta

Białko M – *Membrane protein*; białko błonowe

OUN – Ośrodkowy układ nerwowy

PMR – Płyn mózgowo-rdzeniowy

RBD – *Receptor binding domain*; domena wiążąca receptor

RRSM – *Relapsing-remitting multiple sclerosis*; rzutowo-remisyjna postać stwardnienia rozsianego

SARS-CoV-2 – *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*; drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego

SM – *Sclerosis multiplex*; stwardnienie rozsiane

WHO – *World Health Organisation*; Światowa Organizacja Zdrowia

## 5. Wstęp

### 5.1 Wirus SARS-CoV-2

W listopadzie 2019 r. w prowincji Wuhan w Chinach obserwowano pacjentów z nietypowym przebiegiem zapalenia płuc i powikłaniami wielonarządowymi [1]. Za te zakażenia okazał się odpowiedzialny drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2; *severe acute respiratory syndrom coronavirus*). Chorobę, którą wywołuje wirus SARS-CoV-2 nazwano COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) [2]. W marcu 2020 r. Światowa Organizacja Zdrowia WHO ogłosiła pandemię COVID-19. W dniu 16.06.2023 r. stan zagrożenia epidemicznego na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej został odwołany, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia. do tej pory według oficjalnych danych, na całym świecie, zarejestrowano ponad 700mln zachorowań oraz 7mln zgonów z powodu COVID-19, jednak liczby te prawdopodobnie pozostają niedoszacowane [3].

Wirus SARS-CoV-2 należy do grupy koronawirusów o jednoniciowym RNA. Jest jednym z 7 koronawirusów wywołujących infekcję u człowieka [4]. Jego materiał genetyczny jest w 80% homologiczny z materiałem genetycznym wirusa SARS-CoV-1, odpowiedzialnego za epidemię na Bliskim Wschodzie w latach 2002/2003 [5]. Poza kwasem nukleinowym, SARS-CoV-2 składa się z 4 białek strukturalnych: białka kolca (S), białka nukelokapsydu (N), białka otoczki (E) oraz białka błonowego (M) [4]. Białko S, a dokładnie podjednostka wiążąca receptor (RBD; *receptor binding domain*), odgrywa kluczową rolę w patogenezie infekcji, gdyż łączy się z receptorem dla konwertazy angiotensyny II (ACE II) i tą drogą wirus wnika do komórki gospodarza [6]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że receptory te znajdują się w wielu organach ludzkiego organizmu, takich jak płuca, nerki, naczynia krwionośne, ale również neurony i komórki glejowe ośrodkowego układu nerwowego [7]. Białko N pełni funkcję ochronną dla materiału genetycznego i jest odpowiedzialne za replikację wirusa [8]. Białko E bierze udział w formowaniu wirionów, natomiast białko M jest głównym białkiem macierzy wirusa [8].

Do głównych objawów COVID-19 należą kaszel, gorączka i duszność. W trakcie trwania pandemii zaobserwowano, że większość przypadków choroby ma przebieg łagodny i dobre rokowanie [9] [10]. Jednakże wirus może atakować

wiele narządów w organizmie i prowadzić również do zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), niewydolności wątroby lub nerek [11]. Ponadto w trakcie pandemii COVID-19 odnotowano wzrost częstości występowania kryptogennych udarów mózgu [12] [13]. Powikłania neurologiczne takie jak zespół Guillain-Barré, zapalenie mózgu czy poprzeczne zapalenie rdzenia okazały się być rzadkimi powikłaniami [14] [15] [16] [17]. Natomiast najczęściej odnotowywane objawy neurologiczne podczas infekcji SARS-CoV-2 to: encefalopatia, ból głowy, zawroty głowy, hyposmia/anosmia, hypogeusia/agusia [18]. Ponadto, po ustąpieniu ostrych objawów infekcyjnych, duża grupa pacjentów zgłasza objawy rezydualne, takie jest przewlekłe zmęczenie, osłabienie funkcji poznawczych i obniżony nastrój [19]. WHO wprowadziła termin long-COVID, który zgodnie z definicją, można zdiagnozować, gdy spełnione są następujące warunki: kontynuacja lub rozwój nowych objawów 3 miesiące po infekcji SARS-CoV-2, objawy utrzymują się powyżej dwóch miesięcy a ich występowanie nie jest możliwe do wytłumaczenia inną przyczyną niż przebyty COVID-19. Infekcja SARS-CoV-2 może też pogarszać przebieg wielu chorób współistniejących, w tym chorób układu nerwowego [18].

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie SARS-CoV-2 opiera się na dwóch mechanizmach: odpowiedzi humoralnej i odpowiedzi komórkowej [20] [21]. Odpowiedź humoralna, która wydaje się odgrywać kluczową rolę, polega na produkcji przeciwciał przeciwko poszczególnym białkom wirionu [22]. Najszybciej, w ciągu kilku pierwszych dni od infekcji, pojawiają się przeciwciała w klasie IgM, które są skierowane głównie przeciwko białku N i wykazują wysoki poziom homologii (90%) w stosunku do białek innych koronawirusów patogennych dla człowieka [4]. Przeciwciała w klasie IgA stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami dostającymi się do organizmu człowieka drogą kropelkową, pojawiają się w ciągu pierwszych 10 dni od zakażenia i mogą stanowić wskaźnik wczesnej infekcji. Przeciwciała w klasie IgG stanowią ok. 75% produkowanych przeciwciał, pojawiają się mniej więcej po ok 10-14 dniach od początku infekcji. Okres utrzymywania się przeciwciał jest zróżnicowany osobniczo. po przechorowaniu infekcji, przeciwciała IgG przeciwko białku S utrzymują się we krwi zazwyczaj ok. 10 miesięcy, natomiast u osób które przeszły infekcję łagodną lub bezobjawową ok. 6 miesięcy [23] [24] [25]. Najczęściej w codziennej praktyce, poziom przeciwciał IgG przeciwko białku S oznacza się metodą immunoenzymatyczną (ELISA) [26].

Oprócz klasy przeciwciał istotne kliniczne znaczenie mają ich właściwości neutralizujące. Przeciwciała skierowane przeciwko białku S należą do przeciwciał neutralizujących, czyli chroniących przed kolejnym zachorowaniem [27]. Obecność przeciwciał przeciwko białku S stała się więc wyznacznikiem odporności na reinfekcję oraz czynnikiem ochronnym przed ciężkim przebiegiem potencjalnego zakażenia [28] [29]. Należy zaznaczyć, że dotychczas nie został jednoznacznie ustalony poziom przeciwciał, który chroni przed infekcją [30]. Białko kolca (białko S) stało się punktem uchwytu dla większości szczepionek przeciwko SARS-CoV-2. Co ważne, przeciwciała neutralizujące przeciwko białku S są produkowane zarówno po naturalnym przechorowaniu (immunizacja czynna), jak i po szczepieniu (immunizacja bierna) [30]. Innymi przeciwciałami mającymi znaczenie w praktyce klinicznej są przeciwciała przeciwko białku N, które powstają tylko po naturalnym zachorowaniu, natomiast nie są produkowane po szczepieniu [8]. W przeciwieństwie do przeciwciał przeciwko białku S, przeciwciała przeciwko białku N nie mają właściwości neutralizujących, a więc ochronnych przed infekcją [31].

Kluczowym narzędziem walki z pandemią stały się szczepienia przeciwko SARS-CoV-2. Pierwszą zarejestrowaną szczepionką była szczepionka mRNA ComirnatyPheizer/BioNTech, następnie zarejestrowano kolejny preparat mRNA–Spikevax (Moderna) [32]. Mechanizm działania szczepionek mRNA opiera się na wprowadzeniu do komórki gospodarza materiału genetycznego (mRNA) kodującego białko kolca (białko S) [33]. Na podstawie wprowadzonego mRNA organizm gospodarza syntetyzuje immunogenne białko S, przeciwko któremu następnie wytwarza przeciwciała neutralizujące (odpowiedź humoralna) oraz aktywuje limfocyty T cytotoksyczne (odpowiedź komórkowa) [34]. Kolejną grupą szczepionek są szczepionki wektorowe. Mechanizm działania szczepionek wektorowych polega na wprowadzeniu do organizmu gospodarza wektora–adenowirusa. Wektory wirusowe zostały zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej, w taki sposób, że stały się nośnikami materiału genetycznego kodującego białko S wirusa SARS-CoV-2. Ponadto, co ważne, wektory nie mają zdolności replikacji [33]. Wszystkie wymienione szczepionki mają potwierdzoną skuteczność w badaniach klinicznych i zostały zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*; FDA) oraz Europejską Agencję Leków (*European Medicines Agency*; EMA). Schematy szczepień poszczególnymi

preparatami są zawarte w charakterystykach produktów leczniczych oraz są uaktualniane przez Ministerstwo Zdrowia. Zalecane jest szczepienie również osób, które przebyły COVID-19, gdyż w licznych badaniach wykazano, że odporność hybrydowa, wynikająca z przebytej infekcji szczepienia, jest trwalsza i skuteczniejsza [35].

Już od pierwszych miesięcy trwania pandemii WHO zaleciła ocenę prewalencji wirusa SARS-CoV-2 w schematach powtarzanych badań serologicznych, opisanych w protokole WHO-Unity: “Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 infection” [36]. Badania oparte na tym protokole zostały przeprowadzone w różnych okresach trwania pandemii w wielu krajach świata, w tym w Polsce - w ramach Ogólnopolskiego Badania Seroepidemiologicznego COVID-19 (OBSER-CO) [37]. Dzięki powtarzanym badaniom serologicznym, można pozyskać dane na temat rozprzestrzeniania się wirusa w populacji, zmian w terytorialnej dystrybucji wirusa, zakażeniach bezobjawowych czy też stopnia uodpornienia badanej populacji w związku z wprowadzonymi szczepieniami ochronnymi. Obserwacje bazujące na schemacie seroepidemiologicznych badań przekrojowych mają również zastosowanie w monitorowaniu pandemii w poszczególnych grupach społecznych czy też grupach ryzyka obciążonych konkretnymi schorzeniami [36][38].

## **5.2 Stwardnienie rozsiane**

Stwardnienie rozsiane (SM) jest chorobą autoimmunologiczną ośrodkowego układu nerwowego (OUN), na którą cierpi w Polsce ok. 50 000 osób [39]. Choroba jest rozpoznawana najczęściej u młodych kobiet, ale w grupie chorych znajdują się pacjenci obu płci, we wszystkich grupach wiekowych [40]. Obserwując chorych możemy wyróżnić kilka najczęstszych postaci klinicznych choroby najczęstszą jest postać rzutowo-remisyjna (*relapsing-remmiting multiples sclerosis*; RRMS), rzadziej występują postaci: pierwotnie postępująca (*primary progressive multiple sclerosis*; PPMS) i wtórnie postępująca (*secondary progressive multiple sclerosis*; SPMS). Stwardnienie rozsiane daje różnorodne objawy, które wynikają z obecności ognisk demielinizacyjnych w OUN. Symptomatologia SM u poszczególnych chorych zależy od lokalizacji tych zmian. Do najczęstszych objawów należą m.in.: pozagłokowe zapalenie nerwu wzrokowego, które często bywa pierwszym objawem postaci rzutowo-remisyjnej, zaburzenia czucia, objawy piramidowe, zaburzenia



równowagi i koordynacji, zaburzenia zwieraczy [41]. Ponadto, u wielu pacjentów na przestrzeni lat rozwijają się zaburzenia funkcji poznawczych, objawy depresyjne i zespół przewlekłego zmęczenia [42]. Do klinicznej oceny pacjentów z SM służy Rozszerzona Skala Niepełnosprawności EDSS (Expanded Disability Status Scale) [43].

Diagnostując stwardnienie rozsiane klinicyści opierają się na kryteriach McDonald, według których do postawienia rozpoznania niezbędne jest wykazanie rozsiania choroby w czasie i w przestrzeni [44]. Diagnostyka opiera się przede wszystkim na występowaniu objawów klinicznych, pojawiających się najczęściej podczas rzutów choroby. Nie ma żadnych swoistych testów diagnostycznych. Znaczenie pomocnicze mają badania dodatkowe, takie jak: neuroobrazowanie mózgu i rdzenia kręgowego metodą rezonansu magnetycznego (MRI) oraz badanie białek płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Ogniska demielinizacyjne są najczęściej położone okołokomorowo, przykorowo, w ciele modzelowatym i podnamiotowo [45]. Obecność ognisk wzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego świadczy o aktywności choroby i najczęściej można takie ogniska uwidocznić podczas rzutu choroby [46]. Większość pacjentów w trakcie diagnostyki SM ma wykonywaną punkcję lędźwiową celem pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego. Oprócz badania ogólnego płynu mózgowo-rdzeniowego, ocenia się i porównuje obecność prążków oligoklonalnych w PMR oraz surowicy krwi [47]. Typowe dla SM są prążki typu 2 i 3, których obecność świadczy o wewnątrzoponowej syntezie immunoglobulin. Ponadto, wykazanie obecności tych prążków jest, według aktualnych kryteriów McDonald, ekwiwalentem rozsiania w czasie, co może być niezbędne do postawienia rozpoznania u niektórych chorych [47]. Przed postawieniem rozpoznania SM konieczne jest przeprowadzenie diagnostyki różnicowej.

Aktualnie dysponujemy lekami, które korzystnie modyfikują przebieg stwardnienia rozsianego (ang. *disease modifying therapies*; DMTs). W Polsce są one dostępne w ramach Programu Lekowego finansowanego przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Aktualnie dysponujemy 15 preparatami, do których należą substancje o działaniu immunomodulującym i immunosupresyjnym [48]. Obecnie, celem leczenia stwardnienia rozsianego jest osiągnięcie NEDA 3 (ang. *no-evidence of disease activity*) tj. brak rzutów choroby, brak postępu niepełnosprawności i brak

aktywności rezonansowej [49]. Pierwszymi substancjami stosowanymi w leczeniu rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego były podawane parenteralnie interferony beta 1b i 1a, znane głównie z działania przeciwwirusowego, jednak w terapii SM znaczącą rolę odgrywa ich działanie immunomodulujące [50] [51]. Następnie zarejestrowano, podawany podskórnie, octan glatirameru, również o działaniu immunomodulującym, o nie do końca poznanym mechanizmie działania. Prawdopodobnie moduluje on układ odpornościowy poprzez wypieranie białek mieliny z wiązań pomiędzy białkami głównego układu zgodności tkankowego typu II (MHC II) a komórkami prezentującymi antygen [52]. Fumaran dimetylu jest również często stosowaną cząsteczką w leczeniu SM. Jego mechanizm działania nie został w pełni poznany, jednak badania wskazują, że wynika on głównie z aktywacji ścieżki transkrypcyjnej czynnika jądrowego Nrf2 [53]. Teryflunomid, zmniejsza liczbę limfocytów, poprzez hamowanie aktywności enzymu mitochondrialnego - dehydrogenazy dihydrooratonowej, co skutkuje zmniejszeniem syntezy pirymidyn [54]. Innymi cząsteczkami o działaniu modyfikującym przebieg choroby stosowanym w SM są doustne leki z grupy modulatorów sfingozyno-1-fosforanu, które blokują uwalnianie autoagresywnych limfocytów T z węzłów chłonnych [55]. Najstarszym lekiem z tej grupy jest fingolimod, do nowszych cząsteczek należy ponesimod, ozanimod i siponimod. Ten ostatni jest aktualnie jednym lekiem, obok interferonu beta 1b, zarejestrowanym do leczenia postaci wtórnie postępującej stwardnienie rozsianego [56]. Zastosowanie w leczeniu SM ma również kladrybina. Jest to antagonistą purynowy, który wywołuje efekt cytotoksyczny w stosunku do limfocytów T i B, wbudowując się do łańcucha DNA w miejsce deoksyadenozyny (dA), powoduje pęknięcia helisy DNA, co prowadzi do śmierci komórki [57]. Alemtuzumab jest rzadko stosowanym w Polsce humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko glikoproteinie CD52. Kladrybina oraz alemtuzumab stanowią przykład terapii rekonstytucyjnej układu immunologicznego. Na szczególną uwagę zasługuje grupa leków będących przeciwciałami monoklonalnymi [58]. Należy do nich, oprócz wspomnianego już alemtuzumabu, natalizumab - rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko integrynie  $\alpha 4$ , ograniczające przechodzenie autoreaktywnych limfocytów T przez barierę krew-mózg do OUN [58]. Lek ten może być podawany dożylnie lub podskórnie. Inny mechanizm działania mają podawany dożylnie okrelizumab (przeciwciało humanizowane)

oraz podskórnio ofatumumab (przeciwciało w pełni ludzkie). Obie cząsteczki skierowane są przeciwko antygenom CD20 zlokalizowanym na limfocytach B, w tym również limfocytach B pamięci [59]. Okrelizumab jest aktualnie jedyną cząsteczką zarejestrowaną do terapii zarówno postaci rzutowo-remisyjnej, jak i pierwotnie postępującej SM [60].

Od początku trwania pandemii COVID-19 temat przebiegu infekcji SARS-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym wzbudzał zainteresowanie [61] [62]. Z uwagi na to, że stwardnienie rozsiane to choroba autoimmunologiczna, zastanawiano się, czy pacjenci chorujący na SM należą do grupy szczególnego ryzyka ciężkiego przebiegu COVID-19 [63] [64]. Z jednej strony nieprawidłowe działanie układu immunologicznego, a z drugiej leczenie immunomodulujące i immunosupresyjne stosowane przez pacjentów często przez wiele lat, wzbudzały niepokój zarówno neurologów, jak i chorych [65]. Podejrzewano, że zarówno sama choroba, jak i jej leczenie mogą wpływać na przebieg infekcji, odpowiedź immunologiczną organizmu na infekcję, jak i odpowiedź na szczepienia ochronne [66].

Aktualne dane wskazują, że u pacjentów z SM przebieg COVID-19 nie różni się istotnie od tego w populacji ogólnej [67] [38]. Pojawiły się doniesienia, że pacjenci stosujący niektóre leki modyfikujące przebieg choroby: modulatory receptora dla sfingozyno-1-fosforanu (fingolimod, siponimod, ozanimod, ponesimod), przeciwciała monoklonalne anty-CD20 (okrelizumab, ofatumumab, rytkusymab) oraz alemtuzumab, mogą nie odpowiedzieć na szczepienia ochronne w pełnym zakresie [68]. W przypadku stosowania niektórych z tych terapii (okrelizumab, alemtuzumab) należy zwrócić uwagę na odpowiedni czas przyjęcia szczepionki względem kolejnej dawki leku, co zwiększa szansę na uzyskanie optymalnej odpowiedzi na szczepienie [69]. Jednak zdecydowana większość pacjentów z SM leczona DMT, w tym pacjenci leczeni fumaranem dimetylu, interferonem beta i octanem glatirameru, powinni stosować się do schematów szczepień przeciwko COVID-19 zgodnie z wytycznymi dla populacji ogólnej [70] [71].

## **6. Cel pracy doktorskiej**

Celem pracy doktorskiej była analiza występowania w różnych okresach pandemii COVID-19 przeciwciał przeciwko białku N i białku S wirusa SARS-CoV-2 u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, zamieszkujących w Polsce północno-wschodniej, leczonych wybranymi lekami modyfikującymi przebieg choroby.

## **7. Metodologia**

### **7.1 Analiza dostępnego piśmiennictwa**

Przed przystąpieniem do badań własnych przeprowadzono analizę dostępnego piśmiennictwa w bazach PubMed, Scholar, Cochrane, Scopus, na temat statusu serologicznego u pacjentów z chorobami układu nerwowego, którzy przebyli COVID-19. Na podstawie zebranych publikacji, przygotowano i opublikowano w recenzowanym czasopiśmie pracę pogładową, która powstała w celu usystematyzowania aktualnej wiedzy na ten temat w momencie rozpoczynania badań własnych.

### **7.2 Badania własne**

#### **7.2.1 Grupa badana oraz harmonogram przeprowadzonych badań**

Grupę badaną stanowili pacjenci z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, rozpoznaną według kryteriów McDonalda z 2010 i 2017 r. leczeni wybranymi lekami modyfikującymi przebieg choroby. Włączeni do badania pacjenci pozostawali pod opieką Kliniki Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Każdy z pacjentów został zbadany przez neurologa i oceniony wg. rozszerzonej skali niepełnosprawności (EDSS; *Expanded Disability Status Scale*). Zebrano wywiad lekarski uwzględniający: datę rozpoznania i czas trwania choroby, stosowany DMT, czas stosowania DMT, przebytą infekcję SARS-CoV-2 (data uzyskania dodatniego wyniku test antygenowego lub PCR), przebyte szczepienie przeciwko SARS-CoV-2 (liczba otrzymanych dawek, daty szczepień, zastosowany preparat szczepionki). Szczegółowa charakterystyka grupy badanej znajduje się w pracach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku

(APK.002.230.2020) na przeprowadzenie badań. Każdy z uczestników podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu.

Poniżej (Tabela 1.) przedstawiono harmonogram pobierania materiału do przeprowadzonych badań. W trakcie każdej wizyty od pacjenta pobrano 9 ml krwi pełnej, którą następnie odwirowano, uzyskując surowicę krwi.

<b>Tabela 1. Harmonogram pobierania materiału.</b>			
<b>I ETAP: Analiza obecności przeciwciał przeciwko białkom S i N wirusa SARS-CoV-2</b>			
Numer wizyty (pobrania materiału)	termin wizyty	liczba pobranych próbek	stosowany DMT <sup>1</sup>
<b>wizyta pierwsza</b>	Maj -czerwiec 2020	n= 186	DMF <sup>2</sup> (n=79) INF <sup>3</sup> (n=49) GA <sup>4</sup> (n=37) Inne <sup>5</sup> (n=21)
<b>wizyta druga</b>	Maj-czerwiec 2021	n=88	DMF (n=29) INF (n=34) GA (n=18) Inne <sup>6</sup> (n=7)
<b>II ETAP: Analiza poziomów przeciwciał w klasie IgG przeciwko białkom S i N wirusa SARS-CoV-2</b>			
<b>wizyta trzecia</b>	Grudzień 2021 -luty 2022	n=38	DMF (n=14) INF (n=10) GA (n=14)
<b>wizyta czwarta</b>	Grudzień 2022 - luty 2023	n=38	DMF (n=14) INF (n=10) GA (n=14)
<sup>1</sup> DMT, disease modifying therapies; <sup>2</sup> INF, interferon; <sup>3</sup> DMF; fumarandimetylu; <sup>4</sup> GA octan glatirameru; <sup>5</sup> teriflunomid (n = 11); fingolimod (n = 5); kladribina (n = 3); natalizumab (n = 2) <sup>6</sup> teriflunomid (n = 5); fingolimod (n = 1); kladribina (n = 1)			

### 7.3 Analiza laboratoryjna

Analizę laboratoryjną uzyskanego materiału biologicznego (surowica krwi) przeprowadzono w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

#### **I etap badań : Analiza obecności przeciwciał przeciwko białkom S i N wirusa SARS-CoV-2.**

W trakcie I etapu badań, w latach 2020-2021, oznaczono obecność przeciwciał przeciwko białku S w klasie IgG i IgA, (oznaczone dalej jako: IgG-S, IgA-S) i przeciwko białku N w klasie IgG (oznaczone dalej jako: IgG-N) SARS-CoV-2.

Obecność przeciwciała IgG-S i IgA-S oceniano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA przy użyciu zestawów anty-SARS-CoV-2 IgA i IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Niemcy) stosując się do zaleceń producenta. Wyniki oceniono metodą półilościową poprzez obliczenie wartości stosunku ekstynkcji próbki osoby do ekstynkcji kalibratora. Wyniki interpretowano zgodnie z zaleceniem producenta: wartości współczynników  $<0,8$  były uznawany za ujemny,  $\geq 0,8$  do  $<1,1$  jako wyniki graniczny, oraz  $\geq 1,1$  jako dodatnie.

Obecność przeciwciał IgG-N w surowicy mierzono metodą immunochemiluminescencji (CMIA; *chemiluminescence immunoassay*). Ocenę przeprowadzono na automatycznym analizatorze Alinity (Abbott, Chicago, IL, USA). Otrzymaną reakcję chemiluminescencyjną oceniano we względnych jednostkach światła (RLU). Wynik  $\geq 1,4$  uznawano za wynik pozytywny,  $<1,4$  za ujemny.

#### **II etap badań: Analiza poziomów przeciwciał w klasie IgG przeciwko białkom S i N wirusa SARS-CoV-2.**

W trakcie II etapu badań, w latach 2022-2023, oznaczono jakościowo i ilościowo przeciwciała przeciwko domenie wiążącej receptor (*receptor binding domain*; RBD) podjednostki S1 wirusa SARS-CoV-2 w klasie IgG (dalej oznaczone jako IgG-S1RBD) oraz przeciwciała przeciwko białku N w klasie IgG metodą CMIA (Abbott, IL, USA). Wyniki  $\geq 1,4$  dla przeciwciał IgG-N i  $\geq 50$  AU/ml dla przeciwciał IgG-S1RBD uznano za pozytywne.

## **8. Analiza statystyczna.**

Szczegółowy opis analizy statystycznej znajduje się w pracach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Analizę statystyczną przeprowadzono na podstawie opisu grup pacjentów według DMT i zmiennych demograficznych (płeć, wiek, czas trwania SM, EDSS). jako poziom istotności testów statystycznych przyjęto  $\alpha=0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o model regresji logistycznej i za pomocą liniowego modelu mieszanego. Do pomiaru siły i kierunku związku między dwiema zmiennymi wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana. Całość analizy zrealizowano za pomocą oprogramowanie R (wersja 4.1.0 i wersja 4.1.1, R Core Team 2021).

## 9. Wyniki

### 9.1 Wyniki I etapu badań: analiza obecności przeciwciał przeciwko białkom N i S wirusa SARS-CoV-2.

**Szczegółowe informacje dotyczące wyników I etapu badań zostały zawarte w pracy oryginalnej:** *Kulikowska J, Czarnowska A, Gudowska-Sawczuk M, Kulczyńska-Przybik A, Bazylewicz M, Collins F, Chorąży M, Mroczo B, Kochanowicz J, Kapica-Topczewska K, Kulakowska A. Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies. NeurolNeurochir Pol. 2023;57(1):121-130. Doi: 10.5603/PJNNS.a2022.0067. Epub 2022 Nov 24. PMID: 36421067.*

Podczas **wizyty pierwszej w roku 2020** (n=186) uzyskano wynik dodatni w kierunku obecności przeciwciał przeciwko białku S u 6,98% (n=13) osób badanych. Spośród nich: 7 pacjentów miało przeciwciała w klasie IgA (3,76%; IgG-A) a 6 pacjentów w klasie IgG (3,22% IgG-S). W żadnej z pobranych próbek nie wykryto przeciwciał przeciwko białku N w klasie IgG (IgG-N). Ponadto, do czasu pierwszej wizyty u żadnego z badanych pacjentów nie zdiagnozowano infekcji SARS-CoV-2 (to znaczy: nie uzyskał dodatniego testu PCR/antygenowego do czasu tej wizyty). Szczepionki przeciwko SARS-CoV-2 nie były jeszcze wówczas dostępne.

Podczas **wizyty drugiej w 2021 roku** (n=88) przeciwciała IgG-S zidentyfikowano u 71,3% (n=62) badanych pacjentów, IgG-A u 64,7% (n=55), natomiast najrzadziej, u 18,4% (n=16), wykrywane były IgG-N. Podczas wizyty drugiej, potwierdzenie przebytego COVID-19 zostało odnotowane u 20,45% (n=18) pacjentów. Jedna osoba uzyskała wynik wątpliwy. Średni czas od dodatniego wyniku w kierunku SARS-CoV-2 do momentu oznaczenia przeciwciał wynosił 151 dni (SD ± 66,75). Podczas wizyty drugiej, 42,04% pacjentów (n = 37) było w pełni zaszczepionych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, tzn. otrzymali 2 dawki szczepionki. nie wykazano wpływu rodzaju szczepionki na wytwarzanie przeciwciał. Zaznaczyć należy, że większość uczestników badania (72,97%; n=27) była zaszczepiona preparatem Pfizer-BioNTech (COMIRNATY), w związku z czym nie można wyciągnąć



wiarygodnych wniosków na temat wpływu rodzaju szczepienia na obecność przeciwciał przeciwko białku S.

Przeprowadzono analizę przeciwciał w poszczególnych podgrupach:

- 1) pacjenci COVID (-) i nieszczepieni
- 2) pacjenci COVID (-) i zaszczepieni
- 3) pacjenci COVID (+) i nieszczepieni
- 4) pacjenci COVID (+) i zaszczepieni

W grupie zaszczepionych pacjentów z potwierdzoną przebytą infekcją COVID-19 100% (n=9), miało obecne przeciwciała neutralizujące zarówno IgG-S, jak i IgA-S (odporność hybrydowa). Wśród pacjentów nieszczepionych oraz bez potwierdzonej w przeszłości infekcji SARS-CoV-2 u 50,0% (n=14) wykryto przeciwciała IgG-S, u 42,9% (n=12) IgA-S a u 17,9% (n=5) IgG-N. Wskazuje to, że około połowa pacjentów nieszczepionych ma przeciwciała neutralizujące, chroniące przed reinfekcją. Wynika to prawdopodobnie z przebytej infekcji bezobjawowej/skąpoobjawowej.

Podczas analizy statystycznej wykazano, że szczepienie istotnie statystycznie indukuje obecność przeciwciał przeciwko białku S (IgG-S i IgG-A), natomiast nie indukuje przeciwciał przeciwko białku N (IgA-S,  $p < 0,0001$ ; IgG-S,  $p < 0,0001$ ; IgG-N;  $p = 0,91$ ). nie wykazano zależności statystycznej pomiędzy udokumentowaną infekcją SARS-CoV-2 a obecnością przeciwciał przeciwko białku N. Rozkład przeciwciał nie różnił się pomiędzy pacjentami leczonymi poszczególnymi DMT.

## **9.2 Wyniki II etapu badań: analiza poziomów przeciwciał przeciwko domenie wiążącej receptor białka S1 (S1-RBD) i przeciwciał przeciwko białku N.**

**Szczegółowe informacje dotyczące wyników II etapu badań zostały zawarte w pracy oryginalnej:** *Kulikowska, J.; Kapica-Topczewska, K.; Gudowska-Sawczuk, M.; Kulczyńska-Przybik, A.; Bazylewicz, M.; Mirończuk, A.; Czarnowska, A.; Broła, W.; Mroczko, B.; Kochanowicz, J.; et al. Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in patients with multiple sclerosis treated with immunomodulatory therapies. Vaccines 2024, 12, 255. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030255>*

### **9.2.1. Analiza przeciwciał IgG- S1RBD**

#### **A. Wpływ szczepienia na obecność i poziom przeciwciał IgG-S1RBD**

##### **Obecność przeciwciał IgG-S1RBD**

Podczas wizyty trzeciej w 2022 roku pacjenci z RRMS, zaszczepieni przeciwko wirusowi SARS-CoV-2 stanowili 60,53% (n=23). w grupie zaszczepionych pacjentów 91,30% (n=21) miało obecne przeciwciała IgG-S1RBD. Natomiast w grupie nieszczepionych IgG-S1RBD stwierdzono u 66,67% badanych (n=10). Podczas wizyty czwartej w 2023 roku 71,05% (n=27) pacjentów było zaszczepionych przeciwko SARS-CoV-2. Spośród zaszczepionych pacjentów 96,30% (n=26) miało obecne przeciwciała neutralizujące IgG-S1RBD, podczas gdy w grupie nieszczepionych: 90,91% (n=10).

Analiza statystyczna wykazała, że obecność przeciwciał neutralizujących IgG-S1RBD u pacjentów zaszczepionych i nieszczepionych w latach 2022-2023 nie różniła się istotnie statystycznie (trzecia wizyta:  $p=0,089$ ; czwarta wizyta  $p=0,501$ ).

### **Poziom przeciwciał IgG-S1RBD**

Podczas **wizyty trzeciej w 2022 r.** średni poziom przeciwciał IgG-S1RBD w grupie **zaszczepionych** pacjentów z RRSM wynosił 16863,40 AU/ml, a u **niezaszczepionych** był równy 197,90 AU/ml . Podczas **wizyty czwartej w 2023 r.** średni poziom przeciwciał IgG-S1RBD w grupie **zaszczepionych** pacjentów wyniósł 6997,30 AU/ml, a u grupie **niezaszczepionych** był równy 1342,50 AU/ml. .

Analiza statystyczna wykazała że szczepienie przeciwko SARS-CoV-2 istotnie statystycznie zwiększało poziom przeciwciał IgG-S1RBD (wizyta trzecia  $p < 0,001$  i wizyta czwarta  $p = 0,038$ ). Należy zauważyć, że poziom przeciwciał u pacjentów **niezaszczepionych**, nie osiągnął poziomu obserwowanego u pacjentów **zaszczepionych**.

### **B. Wpływ przebycia infekcji SARS-CoV-2 (potwierdzonej testem antygenowy lub PCR) na obecność i poziom przeciwciał IgG-S1RBD**

#### **Obecność przeciwciał IgG-S1RBD**

Podczas **wizyty trzeciej w 2022 roku**, wszyscy ( $n=7$ ) pacjenci, którzy przebyli potwierdzoną infekcją SARS-CoV-2 (COVID-19 (+)), mieli dodatni wynik w kierunku obecności przeciwciał IgG-S1RBD. w grupie pacjentów, którzy nie przebyli infekcji SARS-CoV-2 (COVID-19 (-)) 77,42% ( $n=24$ ) również miało wynik dodatni. Podczas **wizyty czwartej w 2023 roku** u wszystkich ( $n=9$ ) pacjentów COVID-19 (+) uzyskano pozytywny wynik na obecność przeciwciał neutralizujących. W grupie pacjentów COVID-19 (-) 93,10% ( $n=27$ ) również uzyskało wynik dodatni na obecność przeciwciał IgG-S1RBD.

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic co do obecności przeciwciał neutralizujących w grupie pacjentów, którzy przebyli infekcję SARS-CoV-2 potwierdzoną testem antygenowym lub PCR i w grupie badanych, którzy nie mieli potwierdzonej przebytej infekcji SARS-CoV-2 (wizyta trzecia  $p = 0,309$ ; wizyta czwarta  $p = 1,0$ ), co może wskazywać na szerokie rozprzestrzenienie wirusa w badanej populacji oraz liczne infekcje skąpoobjawowe/bezobjawowe.

### **Poziomy przeciwciał IgG-S1RBD**

Podczas **wizyty trzeciej w 2022 roku**, u pacjentów COVID (+) średni poziom przeciwciał IgG-S1RBD wynosił 27086,20 AU/ml, natomiast wśród pacjentów COVID (-) wynosił on 1953,90 AU/ml. Podczas **wizyty czwartej w 2023 roku**, w grupie pacjentów z COVID-19 (+) poziom przeciwciał IgG-S1RBD wyniósł 3886,90 AU/ml, natomiast u pacjentów COVID (-) 4165,20 AU/ml.

Analiza statystyczna wykazała, że osoby, które przebyły infekcję SARS-CoV-2 (dodatni wynik antygenowy/PCR), miały istotnie statystycznie wyższy poziom przeciwciał IgG-S1RBD podczas wizyty trzeciej ( $p=0,001$ ), nie stwierdzono różnic w poziomach przeciwciał podczas wizyty czwartej ( $p=0,410$ ). Wzrost poziomu przeciwciał neutralizujących u pacjentów bez potwierdzonej przebytej infekcji SARS-CoV-2 również wskazuje na szerokie rozprzestrzenienie wirusa w badanej populacji oraz liczne infekcje skąpoobjawowe/bezobjawowe.

### **9.2.2 Analiza przeciwciał IgG-N**

#### **Wpływ przebytej infekcji SARS-CoV-2 (potwierdzonej testem antygenowy lub PCR) na obecność i poziom przeciwciał przeciwko białku N w klasie IgG.**

Podczas **wizyty trzeciej** u 28,57% ( $n=2$ ) pacjentów COVID-19 (+) stwierdzono obecność przeciwciał IgG-N. Podczas **wizyty trzeciej** w grupie pacjentów z COVID-19 (+) średni poziom IgG-N wyniósł 0,90 AU/ml, natomiast w grupie pacjentów COVID-19 (-) wynosił on 0,14 AU/ml.

Podczas **wizyty czwartej** u 66,67% ( $n=6$ ) pacjentów COVID-19 (+) stwierdzono obecność przeciwciał IgG-N. Podczas **wizyty czwartej** wśród pacjentów COVID-19 (+) poziom przeciwciał IgG-N wyniósł 1,99 AU/ml, natomiast u pacjentów COVID-19 (-) wyniósł on 0,79 AU/ml.

W trakcie obu etapów badania wykazano, że szczepienie nie indukowało obecności przeciwciał przeciwko białku N w klasie IgG. Uzyskany wynik był oczekiwany i zgodny z danymi z literatury.

Analiza statystyczna wykazała, że występowanie przeciwciał IgG-N u pacjentów COVID-19 (+) i COVID-19 (-) nie różniły się istotnie statystycznie (wizyta trzecia:  $p=0,223$ ; wizyta czwarta  $p=0,249$ ). Wykazano jednak, że pacjenci COVID (+) mieli statystycznie istotnie wyższy poziom przeciwciał IgG-N podczas trzeciej wizyty ( $p=0,040$ ) niż pacjenci COVID (-), nie stwierdzono różnic podczas wizyty 4 ( $p=0,363$ ).

## 10. Wnioski

- Pacjenci chorujący na rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego, leczeni intereptonem beta, octanem glatirameru i fumaranem dimetylu są immunokompetentni. Szczepienie przeciwko SARS-CoV-2 w badanych podgrupach pacjentów istotnie indukowało wytwarzanie przeciwciał neutralizujących oraz zwiększało ich poziom.
- Obserwowany, w trakcie kolejnych lat trwania pandemii, wzrost odsetka pacjentów seropozytywnych, którzy nie mieli zdiagnozowanej infekcji i nie zostali zaszczepieni przeciwko SARS-CoV-2 wskazuje na liczne zachorowania skąpoobjawowe/bezobjawowe.
- Nasilenie zapadalności na COVID-19 w grupie badanej, w różnych okresach pandemii, było zbliżone do stwierdzanego w polskiej populacji ogólnej.
- U wszystkich pacjentów z potwierdzoną w przeszłości infekcją SARS-CoV-2 i zaszczepionych na COVID-19 wykazano obecność przeciwciał neutralizujących, co sugeruje, że w badanej grupie pacjentów duże znaczenie dla ochrony przed infekcją ma odporność hybrydowa i wskazuje na celowość szczepienia osób, które przebyły już infekcję SARS-CoV-2.
- Szczepienia ochronne nie wpływają na produkcję przeciwciał przeciwko białku N.

## 11. Publikacja 1.





International Journal of  
Molecular Sciences



Review

# The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review

Joanna Kulikowska <sup>1</sup>, Agnieszka Kulczyńska-Przybik <sup>2</sup> , Barbara Mroczko <sup>2</sup>  and Alina Kulakowska <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland;

joanna.kulikowska@umb.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Neurodegeneration Diagnostics, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland; agnieszka.kulczynska-przybik@umb.edu.pl (A.K.-P.); mroczko@umb.edu.pl (B.M.)

\* Correspondence: alina.kulakowska@umb.edu.pl

**Abstract:** SARS-CoV-2/Coronavirus 2019 (COVID-19) is responsible for the pandemic, which started in December 2019. In addition to the typical respiratory symptoms, this virus also causes other severe complications, including neurological ones. In diagnostics, serological and polymerase chain reaction tests are useful not only in detecting past infections but can also predict the response to vaccination. It is now believed that an immune mechanism rather than direct viral neuroinvasion is responsible for neurological symptoms. For this reason, it is important to assess the presence of antibodies not only in the serum but also in the cerebrospinal fluid (CSF), especially in the case of neuro-COVID. A particular group of patients are people with multiple sclerosis (MS) whose disease-modifying drugs weaken the immune system and lead to an unpredictable serological response to SARS-CoV-2 infection. Based on available data, the article summarizes the current serological information concerning COVID-19 in CSF in patients with severe neurological complications and in those with MS.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV-2; neuro-COVID; serology; antibodies; cerebrospinal fluid; multiple sclerosis



**Citation:** Kulikowska, J.; Kulczyńska-Przybik, A.; Mroczko, B.; Kulakowska, A. The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5894. <https://doi.org/10.3390/ijms22115894>

Academic Editor:  
Wolfgang Baumgärtner

Received: 11 May 2021  
Accepted: 25 May 2021  
Published: 31 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Coronavirus 2019 (COVID-19) is a newly emerging disease, which has caused a global pandemic as announced by the World Health Organization (WHO) in March 2020 [1]. Severe acute respiratory virus-2 (SARS-CoV-2), the virus responsible for COVID-19, has affected over 151 million people and contributed to over 3 million deaths [2]. SARS-CoV-2 is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus and is composed mainly of N (nucleocapsid), S (spike), M (membrane) and E (envelope) proteins [3,4]. Entrance into a host cell is induced by a connection between a spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor. The same mechanism was responsible for the SARS pandemic in 2002/2003 [5]. The incubation period of the disease is 2–14 days, and its main symptoms include fever, cough and shortness of breath [6]. A SARS infection can lead to pneumonia and acute respiratory distress syndrome that can result in death [7]. According to present data 99.6% cases are mild, and 0.4% are serious or critical [2]. The severe course mainly involves the elderly and patients with comorbidities [8,9]. However, recently, some new variants (such as B.1.1.7 [or VOC 202012/0], B.1.351 [or 501.V2], B.1.617) with many new mutations have emerged and are potentially more virulent and infectious, and more importantly, cause severe disease in young people in addition to the elderly [2,10]. Due to the presence of asymptomatic infections, the number of infected people remains underestimated [9]. For routine diagnostic processes, molecular tests, such as polymerase chain reaction in real time (qPCR), which indicates the acute phase of the disease, and serological tests that can

detect specific antibodies are used [11]. The second type of test can determine whether the patient has had contact with the virus, determines its serological status and is used, among others, in epidemiological studies assessing the incidence of SARS-CoV-2 infection in the population [12]. A crucial issue is the body's immune response to SARS-CoV-2 infection. During infection, an increase in the production of numerous proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis alpha and interleukins-2 and -6 (TNF- $\alpha$  and IL-2 and -6, respectively) is observed [13]. A severe course of SARS-CoV-2 infection is undeniably connected with dysregulation of immune system and cytokine release syndrome [8]. Part of the immune response also involves the production of antibodies, mainly against S and N proteins, also known as neutralizing antibodies. The crucial role of these antibodies is to block virus entrance into host cell and activation of antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). As a result, the disease could be defeated, or the immune system's overactivity could induce a cytokine storm [12]. In addition, patients showed a reduction in B- and T-lymphocytes and natural killer (NK) cells. Both the increase in inflammatory cytokines and the decrease in lymphocyte counts are associated with the severity of the disease [13]. Due to the fact that entry into the human cell is associated with the ACE2 receptor and these receptors also exist on neurons and glial cells, speculations about the neurotropism of SARS-CoV-2 began [14]. From the early stages of the pandemic, neurological symptoms have been described, of which the most common are anosmia, ageusia, headaches and dizziness (Table 1) [15]. In addition, the course of COVID-19 may be associated with much more severe neurological complications, such as encephalopathy, Guillain-Barre syndrome, meningitis, encephalitis and/or necrotizing hemorrhagic encephalopathy [15,16]. Moreover, the relationship between SARS-CoV-2 infection and acute cerebrovascular diseases, such as acute ischemic stroke, cerebral venous sinus thrombosis, cerebral hemorrhage and subarachnoid hemorrhage, were sought [15]. During studies on the neuroinvasiveness of SARS-CoV-2, the presence of anti-SARS-Cov-2 antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) and intrathecal synthesis were found; interestingly, in these cases, the PCR results from nasopharyngeal swabs remained negative [17]. Reports of possible cross-reactions with human proteins and formation of autoantibodies and as a consequence, development of autoimmune encephalitis have been published [18]. As previously mentioned, the severe course of COVID-19 is associated with the presence of comorbidities in people. It can be assumed that such comorbidities are neurological disorders, such as multiple sclerosis (MS). An interesting issue is the serological status of people with MS, especially those undergoing treatment with disease-modifying therapy. The current data suggest that even in the presence of an altered immune system, the risk of severe course and serological status are similar to those in the general population [19]. This review summarizes the current knowledge of severe neurological complications in COVID-19 and the serological status of those with neurological diseases.

**Table 1.** Neurological symptoms and possible complications related to severe acute respiratory coronavirus -2 (SAR-CoV-2) infection.

Coronavirus-2019 (COVID-19) and Neurological Disturbances		
Neurological Symptoms	Severe Neurological Complications	COVID-19 Complicates Course of Neurological Diseases
Headaches	Guillain-Barre Syndrome	Multiple sclerosis
Dizziness	and Miller-Fisher Syndrome	Neuromyelitis optica
Seizures	Acute Transverse Myelitis	spectrum disorders
Anosmia/hyposmia	Encephalopathy	Epilepsy
Ageusia/hypogeusia	Demyelination	Amyotrophic lateral
Hypoesthesia	Encephalitis/meningoencephalitis	sclerosis,
Paresis and paralysis	Autoimmune encephalitis	Parkinson disease
Disturbances of consciousness	Necrotizing hemorrhagic	Dementia
Urination disorders	Encephalopathy	
	Ischemic stroke	
	Cerebral hemorrhage	
	Cerebral venous sinus thrombosis	
	Subarachnoid hemorrhage	



## 2. Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: Most Important Facts

A critical issue that is necessary for understanding the processes occurring during viral neuroinvasion is the immune response to SARS-CoV-2 infection. It is worth noting that 80% of the viral RNA is identical to that in SARS-CoV. Therefore, some mechanisms described in 2002/2003 can also be applied to the present pandemic [4,20]. After the virus enters the body, it is likely that any antigen can be presented by the major histocompatibility class 1 (MHCI), which leads to stimulation of both CD4 + and CD8 + T-cells [3,20]. As a consequence of many processes, the production of antibodies most often against the N protein and the receptor-binding domain (RBD) of the S protein occurs. Anti-S antibodies are called neutralizing antibodies [3]. It has been assumed that the early CD4 + and CD8 + response is protective, and if it is not inhibited after a while, the late response is excessive and destructive for the organism [21,22]. It is worth mentioning that the SARS-CoV-2 infection is divided into four phases, of which phase III is characterized by an abnormal inflammatory response, which is associated with systemic complications and extrapulmonary manifestation of the disease that led to phase IV infection, including acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multi-organ failure [23,24]. In critically ill patients, a drastic decrease in T-lymphocytes has been noted [21,25]. Interestingly, this finding turned out to be inversely related to the amount of pro-inflammatory cytokines that were produced [21]. The recovery of the CD4 + and CD8 + populations was associated with their decline and improvement in the patient's clinical condition [21]. This excessive inflammatory response is associated with a large number of pro-inflammatory cytokines, including interleukins-2, -6 and -7 (IL-2, -6 and -7,) macrophage inflammatory protein 1, monocyte chemoattractant protein 1, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and colony-stimulating factor, and is called a cytokine storm [26]. A similar phenomenon has already been described in the case of infections with Epstein-Barr virus as the so-called hemophagocytic lymphohistiocytosis with sudden and fatal hyperketonemia leading to the syndrome of multi-organ failure [20,27,28]. A cytokine outbreak leads to an influx of neutrophils to the lung parenchyma and, consequently, to excessive myelopoiesis [21]. The resulting immature neutrophils are believed to have immunosuppressive properties [21]. IL-6 and ferritin levels have proven to be associated with an increase in COVID-19 mortality [13]. This "viral sepsis-like syndrome" is the focal point when treating COVID-19 using a biological drug called Tocilizumab [23]. The drug is a monoclonal antibody directed against IL-6, which leads to an improvement in the lungs' condition in 77% of patients [21,29]. In contrast to excessive inflammatory responses, CD8 + lymphocytes and interstitial macrophages in the lungs produce anti-inflammatory IL-10, which limits infection [21]. In summary, the body's immune response may turn out to be either adequate to respond to the ongoing infection and result in disease control, or it may be excessive and fatal [26].

## 3. Serology in SARS-CoV-2 Infection

Currently, qPCR remains the gold standard for diagnosing an active SARS-CoV-2 infection. Despite the high sensitivity and specificity of the test, a risk of obtaining a false positive (sample contamination) or a false negative (incorrect storage of the collected material) results exists [2,30]. Serological tests are a valuable supplement to the diagnosis of SARS-CoV-2 as they enable retrospective detection of infection and remain irreplaceable in population studies. Moreover, they are cheaper, easier to make and the collected material is less complicated to store [3]. These types of tests are also invaluable in assessing the risk of infection in risk groups. To understand the mechanism of serological diagnostics, it is worth reviewing the structure of the SARS-CoV-2 virus. This virus consists of structural proteins, the most important of which in serological terms are the nucleocapsid protein (N) and the spike protein (S) as almost all serological methods detect the IgG and IgM produced against these proteins. The S protein is a homotrimer whose key element is the S1 subunit and the receptor binding domain (RBD) against which the neutralizing antibodies are being produced [3]. The S1 subunit has been shown to be the most specific for SARS-CoV-2, while the N protein is produced in the greatest amount [30,31]. It was

shown that the antibodies against the N protein correspond more closely to the previous SARS-CoV-2 infection, while the antibodies against the S protein are part of the humoral response and have a greater neutralizing potential [32]. Coronaviruses are respiratory tract viruses, and because they come into contact with mucous membranes in the respiratory tract, they induce the formation of IgA antibodies, while at present, the diagnostics of IgM and IgG antibodies is of the greatest clinical importance [12]. Researchers disagree about the order in which seroconversion occurs in the SARS-CoV-2 infection. It has been reported that the typical order of production is IgM first after which IgG is absent [33]. However, other studies have shown that seroconversion occurs in a manner similar to other infections. A study of 173 patients with SARS-CoV-2 infections showed that conversion of total antibodies, IgM and IgG was 93.1%, 82.7% and 64.7%, respectively. The mean seroconversion times in this study were 11, 12 and 14 days, respectively [3]. Similarly, in a study on 214 patients, it was shown that the highest sensitivity involved detection of IgM antibodies to the S protein. In this study, the sensitivity in the IgM class was 77.1%, and IgG was 74.3%. For comparison, the sensitivity to the N protein was 68.2% in the IgM class and 70% in the IgG class [3]. The median detection of IgA of 5 days and IgG of 14 days were also compared. Comparing the IgM and IgA responses, the corresponding peak response was obtained on days 10–12 and 20–22 of the disease, respectively [34]. The IgA response turned out to be stronger and more durable than the response associated with IgM. A meta-analysis of 3856 confirmed cases showed that the positive index of IgM, IgG and their combined detection amounted to 61.2%, 58.8% and 62.1%, respectively. Furthermore, it turned out that IgM/IgG was detected in 19% of asymptomatic cases [35]. In addition to the enzyme-linked immunosorbent and chemiluminescent assay (ELISA and CLIA, respectively) methods that are most commonly used in serological diagnostics, it is worth mentioning the lateral flow immunoassay, which can detect total IgG or IgM even in 15 min [36]. The meta-analysis showed a sensitivity for these tests ranging from 72.2% to 100% and a specificity from 98.9% to 100% [36]. Another serological method is the magnetic chemiluminescence test, which is based on the double antibody sandwich method. This test demonstrates concurrent seroconversion for IgG and IgM. After 19 days of illness, 100% of patients had positive IgG. The antibodies reached a plateau after six days of seroconversion [37]. However, the ELISA test is still the most frequently used technique. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values for IgM were assessed as 87.5%, 100%, 100%, 95.2%, respectively, and for IgG, these values were 70.8%, 96.6%, 85%, 89% and 1%, respectively [3]. The mechanism of action of the antibodies produced by plasma cells occurs via prevention of virus entry into the cell by shielding the N and S proteins and activating antibody-dependent cytotoxicity. Interestingly, it was shown that patients with a more severe disease course had an earlier and higher antibody response. This phenomenon, called antibody-dependent enhancement (ADE), can be explained by the fact that anti-S antibodies inhibit viral entry into the cell, thereby enhancing the binding of the virus to B-cells and macrophages via the Fcγ-II receptor after which these cells are activated, and the cytokine storm intensifies [38]. Serological tests have their advantages, but their limitations should be kept into consideration. Researchers should be aware of the possibility of false-negative results in cases in which the patient has not yet developed antibodies. It is worth noting that despite the time of seroconversion determined in many studies, individual variability also exists. False positive results may be the result of a cross-reaction between other human coronaviruses. Determining antibodies also requires skillful interpretation of the selected test. Due to the above factors, serological tests remain additional tools in the diagnosis of the SARS-CoV-2 virus [35].

#### 4. Cerebrospinal Fluid Serology: General Information

Substantial evidence in favor of the destructive effects of COVID-19 on the nervous system has been provided by studies conducted on post-mortem brain tissues collected from patients who had COVID-19. During an autopsy of people who died from COVID-19, the virus was detected in cortical neurons, and inflammatory response was observed in

the brain tissue [39]. Moreover, the S1 protein has been shown to damage the endothelial cells in the brain by disrupting the blood-brain barrier (BBB) [40]. However, the exact mechanism action of COVID-19 virus on the central nervous system is still unknown. The most common neurological manifestations observed in patients with SARS-CoV-2 infection are dizziness, headaches and confusion. In an extensive study by Saiegh et al. involving 214 cases with confirmed SARS-CoV-2 infection, it was revealed that up to 36.4% of patients presented such neurological symptoms [41].

Most of the literature concerns serological diagnostic tests in the serum of patients with neuro-COVID diseases; few studies have been conducted in cerebrospinal fluid, and findings seem to be inconsistent (Tables 2 and 3). Before discussing the reports on serology, in particular neuro-COVID diseases, it is worth becoming acquainted with the general issues concerning antibodies in the cerebrospinal fluid and its biochemical features in case of neurological symptoms. It would be interesting for researchers to determine whether this unexceptional virus neurotropism is detected in cerebrospinal fluid (CSF) and whether a specific CSF biomarker exists for neuroinvasion. In the beginning, it is worth noting that serology turned out to be much more useful for the assessment of neuroinvasion than did the PCR test. One of the first studies concerning neurological patients revealed that two patients with ischemic stroke and confirmed COVID-19 based on nasopharyngeal swabs had negative PCR results from the cerebrospinal fluid [41]. In the next study, thirty patients with neurological symptoms were examined, and none of them showed positive PCR results from CSF samples [42]. Similar findings were obtained from one of the largest retrospective studies. In 555 CSF samples from patients with genetically confirmed COVID-19, all but two samples had negative PCR results. Interestingly, two positive samples were collected post-mortem [43]. On the other hand, inconsistent data are also found in the literature. A study by Moriguchi et al. confirmed direct invasion by COVID-19 into the nervous system. In the first described case of meningitis, the authors observed negative PCR from the swab and positive from the CSF [16]. These findings agreed with another study in which subjects suspected of demyelination associated with SARS-CoV-2 infection also had positive PCR results from CSF samples [44]. The positive CSF PCR seems to be related to more serious neurological manifestations. So far, no large studies have been conducted to assess the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the CSF. However, findings from smaller studies indicate a substantial role for SARS-CoV-2 antibodies in CSF. Eight patients hospitalized in the intensive care unit (ICU) were examined, and each of them had antibodies against SARS-CoV-2 virus in the CSF as determined using the ELISA method (Euroimmun, Lübeck, Germany). However, none of the detected autoantibodies were characteristic for autoimmune encephalitis (anti-N-methyl-D-aspartate receptors, NMDAR, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxale-type glutamate, gamma aminobutyric acid, contact-associated protein-like 2, dipeptidyl-peptidase-like protein, leucine-rich and glioma-inactivated 1 receptors (AMPAr, GABA<sub>B</sub>r, CASPR2, DPPX and LGI1, respectively). Similarly, CSF PCR results were negative in all patients. Interestingly, in one patient, intrathecal antibody synthesis was detected, and in three subjects, disruption of the BBB was detected. Additionally, three patients were positive for the 14-3-3 protein, which indicated an ongoing neurodegenerative process [17]. In the case report of two patients with neurological symptoms, antibodies against SARS-CoV-2 were detected in the CSF. The leakage rates were 1.08% and 3.12%, which indicate that the presence of these antibodies in the cerebrospinal fluid was due to leakage rather than intrathecal production. Additionally, the presence of the viral proteins N, S1 and S2 was detected. The samples were strongly positive for N and weaker but also positive for the S1 and S2 proteins [45]. A growing body of evidence indicates the possibility of autoantibody formation during the course of SARS-CoV-2 infection, which is very interesting due to the possible mechanism explaining the course of neuroinvasion. Franke et al. assessed serum levels of autoantibodies in 11 critically ill patients with confirmed COVID-19 who presented new neurological symptoms, such as myoclonus, seizures, dystonias and oculomotor disturbances. Interestingly, all tested patients showed anti-Yo receptor or anti-NMDA receptor antibodies in addition to

“various specific, undefined epitopes, resembling the binding of brain tissue observed with some human SARS-CoV-2 monoclonal antibodies” [46]. A few literature studies suggest that neurological diseases may develop as a complication following SARS-CoV-2 infection. For example, a Spanish group of researchers reported a patient with asymptomatic SARS-CoV-2 infection and hypoesthesia in the limbs and perineum. The radiographic image corresponded to acute transverse myelitis, and CSF tests showed bands corresponding to IgM anti-GD2 and GD3 antibodies [47]. A negative PCR result and the presence of antibodies or autoantibodies strongly suggest that the indirect mechanism of SARS-CoV-2 is via an attack on the nervous system. Some researchers suggest that secondary damage to the nervous system cells may be caused by the phenomenon of immune mimicry between viral proteins and human antigens as described, for example, in the case of encephalitis after infection with the herpes simplex virus. The phenomenon of molecular mimicry consists in exterminating the structural similarity between antigens of microorganisms and human ones. As a consequence, in cases in which an infection occurs, the resulting antibodies will attack not only the microorganism but also its own tissue antigens [48,49]. Many other viruses, such as other coronaviruses, adenoviruses and enteroviruses, are also suspected of inducing autoimmune processes [50]. Perhaps the neuro-COVID syndrome will prove to be similar to the lethargic encephalitis that occurred during the influenza pandemic of 1918 [51]. The hypothesis of the autoimmune mechanism of neurological symptoms may be confirmed by studies on autopsy cases in which pathological changes, mainly in the brainstem and cerebellum corresponding to the picture of autoimmune encephalitis, were described. The presence of the virus was detected in half of the tested preparations; however, it did not correlate with the severity of the brain damage, which further supports the immune mechanism of neuroinvasion [52]. A literature review also allows general conclusions to be drawn about the changes in the CSF study. Pleocytosis is very common and usually presents with increased lymphocytes and possible elevated levels of protein. An increase in the level of albumin indicates damage to the BBB. Moreover, in some patients, oligoclonal bands were found [48,53]. Additionally, reports in the literature can be found in which levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and monocyte chemoattractant protein [MCP]-1) in CSF were determined, and it was found that they remained elevated [54]. Encephalopathy and other neurological symptoms are seen in many seriously ill patients, possibly due to several mechanisms: (1) direct viral neuroinvasion may occur, which is explained by the presence of ACE2 receptors in cells of the nervous system, (2) neurological symptoms occur as a result of systemic biochemical and metabolic complications and (3) the BBB can be damaged by an excessive inflammatory response and multiple mediators. In the light of the cited studies, the latter hypothesis seems to be the most justified as it explains the negative PCR in most studies and the presence of SARS-CoV-2 antibodies, autoantibodies and abnormalities in the general CSF test [17].

**Table 2.** Serology and polymerase chain reaction (PCR) in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with neurological manifestation during SARS-CoV-2 infection.

N	Neurological Complication	PCR	PCR in CSF	Serology	Antibody Class	Time after Infection	Methodology	Ref.
2 patients	Ischemic stroke	+	-			Not given		[7]
30 patients	Guillain-Barre syndrome, encephalopathy, seizures, ischaemic stroke and others	+	-			Not given		[8]
555 patients	Headaches, meningitis or no neurological symptoms	+	+ (in 2/555)			Not given		[9]
Case report	Meningitis	-	+			Not given		[10]
Case report	Demyelination	-	+			Not given		[11]
8 ICU	Encephalopathy	+	Not given	+	IgG	During hospitalization	ELISA	[1]
2 patients	Encephalopathy	+	Not given	+	Not given	>16 days During hospitalization	ELISA	[12]
11 ICU patients	Myoclonus, seizures, dystonias, oculomotor disturbances	+	Not given	anti-Yo receptor anti-NMDA receptor antibodies	Not given	During hospitalization	Cell-based assays and indirect immune fluorescence	[13]
Case report	Hypoaesthesia in the limbs and perineum	+	-	anti-GD2 and GD3 +	IgM	During hospitalization	not given	[14]

Abbreviation: Intensive care unit (ICU), PCR: polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked polymerase chain reaction.

**Table 3.** Serology in the severe neurological manifestation of Coronavirus 2019 (COVID-19).

N	PCR Swab	PCR in CSF	Antibodies	Ref.
Case report	-	+	Not tested	[10]
Meningoencephalitis and autoimmune encephalitis	54 patients	+	Not tested	[15]
	2 patients	+	Not tested	[16,17]
	10 Patients	+	Not tested	[14]
Acute myelitis	Case report	+	IgM ant GD2/GD3	[14]
	Case report	+	Lupus anticoagulant	[18]
	Case report	+	Anti-GD1	[19]
Guillain-Barré syndrome	83 patients	+	Not given	[20]
			- in 31 out 36 tested + in 5 out of 36 tested (anti-G1b, anti- asialo GM1, anti-GD1a, anti-GM2)	

## 5. Serology in Severe Neurological Manifestations of COVID-19

### 5.1. Meningoencephalitis and Autoimmune Encephalitis

Meningoencephalitis has a wide possible etiology. Viruses are known causes of this disease; they are responsible for often varied clinical picture and characteristic changes when examining the CSF. The SARS-CoV-2 virus was suspected of causing meningitis and meningoencephalitis during the first months of the pandemic. In the first described case, PCR from the nasopharynx was negative with a positive result from the CSF. At that time, the CSF was not tested for the presence of antibodies and autoantibodies [16]. One of the largest studies to date that included patients with meningitis was a meta-analysis of 54 cases of meningitis in patients with COVID-19. Interestingly, the virus was detected in the CSF of three patients. Additionally, in the analyzed CSF results, the following

laboratory tests turned out to be statistically significant: (1) total protein ( $n = 18$ ;  $p = 0.004$ ), (2) lymphocytes ( $n = 6$ ;  $p = 0.009$ ) and (3) IgG ( $n = 5$ ;  $p < 0.0001$ ). The described studies showed a statistically significant reduction in IgG levels, which could be explained by the hypoglobulinemia resulting from lymphopenia [55,56]. Contradictory results are presented in a study by the scientists from Wuhan, who found meningeal symptoms in a patient with SARS-CoV-2 and demonstrated a positive PCR swab result but did not detect any antibodies in the cerebrospinal fluid despite a diagnosis of COVID-19-related meningitis [57]. Anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) autoantibody encephalitis is a neurological and psychiatric symptomatic disorder, often on the psychotic spectrum. During the pandemic, reports concerning the presence of autoantibodies in the CSF of patients with encephalitis after COVID-19 infection have been published. For example, in a 23-year-old man from Ecuador with COVID-19 who developed psychotic symptoms had anti-NMDA antibodies in the CSF and was diagnosed with autoimmune encephalitis [58]. Likewise, in a 50-year-old male with COVID-19 symptoms, development of refractor epilepticus status was suspected because anti-NMDA antibodies in the CSF in addition to pleocytosis and oligoclonal bands were detected [59].

### 5.2. Acute Myelitis

Acute myelitis is a disease with various possible etiologies. It is often the first symptom of other neurological diseases, such as MS [60]. Moreover, it is also often associated with a previous viral or bacterial infection that triggered autoimmune mechanisms [61]. During the SARS-CoV-2 pandemic, myelitis in patients with COVID-19 has been reported. In a study, PCR from CSF samples, antibodies and autoantibodies were found. The most common acute myelitis-associated symptoms are sensory disturbances, paresthesia, paresis and spinal pain. The radiographic images most often show hyperintense signals on T2 images, characterized by longitudinal myelitis [62]. In study of COVID myelitis cases, it was found that the most common changes in the cerebrospinal fluid were lymphocytosis and elevated protein levels. Oligoclonal bands were usually negative. The CSF PCR test was negative in each analyzed case [47]. An interesting case was presented by a 60-year-old woman with transverse myelitis with positive IgM anti-GD2 and IgM anti-GD3 antibodies [47]. One case report suggests the possibility of a lupus anticoagulant in acute myelitis accompanying the COVID-19 infection. Literature data show COVID-19 and lupus anticoagulant coexistence in 45% to 87% of patients, especially those hospitalized in the intensive care unit (ICU). No studies assessing the relationship between lupus anticoagulant and neurological complications have been published [63]. A review of the literature indicates more cases of myelitis (about 15 studies so far) while the analysis of the tests performed allows us to state that the determination of antibodies against SARS-CoV-2 in CSF is not a routine test, which does not allow clear conclusions about the serological status of these patients to be drawn.

### 5.3. Guillain-Barré Syndrome

Guillain-Barré syndrome (GBS) and its variants, such as Miller-Fisher syndrome, is an acute autoimmune neuropathy that can lead to ARDS and consequently, to death. The most frequently reported symptoms of GBS include symmetrical limb paresis, cranial nerves palsy and sensory disturbances. It is recognized that the disease is related to a recent bacterial or viral infection [64]. The phenomenon of molecular mimicry is the mechanism responsible for GBS pathogenesis. The data show a cross-reaction between pathogenic antigens and peripheral nerve components, mainly gangliosides. The antibodies anti-gangliosides, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b, are included in the panel of the most frequently measured antibodies. The most common antibody in GBS is anti-GM1, while anti-GQ1b is associated with the Miller-Fisher variant [65,66]. During the COVID-19 pandemic, an increase in the number of GBS cases was observed, and interestingly, the average age of patients in these pandemic-associated cases was also higher than in GBS cases before COVID-19 [67]. A few review articles about the relationship between GBS and

COVID-19 have appeared in the literature so far. In the most recent study, they reported that of 36 cases in which the autoantibody panel was evaluated, 31 were negative and five were positive. Interestingly, no case of anti-GM1 antibodies has been reported in classical GBS, and no case of anti-GQ1b antibodies in Miller–Fisher variant [65]. As shown above, the vast majority of cases remained negative for the presence of anti-ganglia antibodies that are characteristic of pre-pandemic GBS in up to 88% of patients [66]. In the analyzed cases, the typical GBS treatment (an infusion of intravenous immunoglobulins) was used with great effectiveness [65]. This finding suggests that GBS after COVID-19 may have an autoimmune basis. Based on this information, it is suspected that the SARS-CoV-2 virus induces an autoimmune response through different autoantigens than before [65]. One theory states that the presence of anti-ganglioside antibodies is related to the axonal subtype of GBS, while the lack of these antibodies suggests a demyelinating effect [68]. This process gives rise to the assumption that the SARS-CoV-2 virus may cause demyelination in the nervous system. In the case reports published so far, routine determination of antibodies against SARS-CoV-2 has not been done. Therefore, the serological status of these patients is unknown. Positive CSF PCR was not demonstrated in any of the cases described in these papers [65,68]. An interesting case was presented in a study describing a patient who returned to the hospital after COVID-19 with neurological symptoms, including dizziness, eye movement disorders and disorientation. Anti-GD-1 antibodies were found in the serum, and Bickerstaff encephalitis was diagnosed [69,70].

#### 6. Serology in Multiple Sclerosis in the Course of COVID-19

Comorbidities are an acknowledged risk factor of severe COVID-19. MS has been considered such a disease since the beginning of the pandemic. MS is an autoimmune disease in which demyelination occurs in the central nervous system as a result of autoantibody formation in response to myelin proteins. Concern over the severe course of COVID-19 is caused not only by the disease itself, in which the immune system remains altered, but also by disease-modifying treatments (DMTs). These drugs cause various types of immunosuppression and can affect both the course of the infection and the serological response after infection [71]. Interestingly, viral infections, including coronaviruses, can be a pathogenetic factor in multiple sclerosis. In addition, intrathecal synthesis of anti-HCoV antibodies against coronaviruses has been reported in MS patients [14,72]. Currently, various disease-modifying drugs, which have different mechanisms and differently influence the serological response after an illness, are used in the treatment of MS (Table 4). To date, reports of some of these drugs affecting the presence of seroconversion following SARS-CoV-2 infection can be found [71]. Cladribine is a drug that restores the immune system and has proven long-term efficacy. Concerns about this therapy are related to the risk of severe infections due to possible lymphocyte depletion [73]. The literature describes a case of a 35-year-old woman with MS who underwent two 5-day cycles of cladribine treatment a year ago and developed a mild SARS-CoV-2 infection. Antibodies to SARS-CoV-2 were positive three months after the disease (no antibody class or method of determination was given) [74]. Another patient with a short disease duration, who was using cladribine from January 2020 and had mild lymphopenia ( $0.9 \times 10^9/L$ ) did not develop a serological response even after four months after contracting a SARS-CoV-2 infection. A 40-year-old patient described in the same article who had a long history of the disease and was treated with cladribine in February and March 2020 achieved seroconversion four months after contracting COVID-19 [75]. Contradictory findings were obtained by Gelibter et al., who reported a patient also with mild COVID-19 but who did not seroconvert IgM and IgG. The lymphocyte count was then  $730/\mu L$  [22,76]. Anti-CD20 monoclonal antibodies, such as rituximab and ocrelizumab, are increasingly used drugs, especially in the forms of primary progressive MS. A reduction in the immunoglobulin production, mainly IgG, has been documented. At the beginning of the pandemic, the question arose as to whether people taking anti-CD-20 monoclonal antibodies could be at risk of more severe COVID-19 infections and whether they could develop normal im-

munity after exposure or vaccination [77]. The literature presents a case of a 65-year-old patient who had mild COVID-19 and in whom positive IgA antibodies to SARS-CoV-2 were detected 10 weeks after the infection, while IgG antibodies remained negative [78]. IgA antibodies are associated with the immune system of the mucous membranes, and the detection of IgA antibodies to SARS-CoV-2 in patients treated with ocrelizumab may indicate a lower effect of this drug on mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) compared to other components of the immune system [79]. In another study, five patients treated with anti-CD-20 therapy had negative IgG antibodies. In the same study, another six patients treated with other disease-modifying drugs (teriflunomide, glatiramer acetate, dimethyl fumarate, natalizumab) showed IgG seroconversion. In the above-mentioned study, the minimum time between COVID-19 and antibody testing was 23 days [80]. The literature also includes an example of two patients with relapsing–remitting MS that was treated with ocrelizumab; one patient was a 39-year-old woman and the other was a 42-year-old male after ambulatory-treated COVID-19. Neither of them showed seroconversion in the IgG class. Antibody levels were tested in the female at week 6 and 12 after infection, and in the male at week 7 and 9 post-infection [81]. Similar results were obtained in a 48-year-old woman treated with ocrelizumab, in whom IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies were not detected three months after recovering from COVID-19 despite double testing within a few days [82]. In one study, 84 out of 93 MS patients, whether treated with disease-modifying therapy (DMT) or not, were tested by PCR, serological tests, or both. In 79 patients, serological tests were performed three months after obtaining a positive PCR test. In this study, a serological response was achieved in 17.6% of patients treated with anti-CD-20, 48.8% of those treated with other DMTs and 68.4% of untreated patients [83]. Another drug that binds to CD-20 epitopes is ofatumumab, which is also used in multiple sclerosis treatment [84]. One case report describes a patient suffering from MS who was treated with ofatumumab and showed the presence of IgG and IgM antibodies against the spike protein three months after contracting COVID-19 [85]. Other medications used to treat MS include fingolimod and teriflunomide. Fingolimod is a sphingosine 1-phosphate type 1 receptor modulator that stops the migration of T-lymphocytes from the lymph nodes to the central nervous system, thus limiting the autoimmune process [86]. Teriflunomide inhibits *de novo* pyrimidine synthesis by blocking the enzyme dihydrouridine dehydrogenase [86]. In two post-COVID patients who had been treated with fingolimod or teriflunomide, the serum levels of IgG antibodies against the S1 or N protein of SARS-CoV-2 virus on days 7, 21, 28 and 35 from the time of coronavirus infection diagnosis were examined. The patient treated with fingolimod achieved a limited serological response only against the N protein, which was defined as being slightly positive at day 35, whereas in a patient treated with teriflunomide detected anti-N and -S antibodies on day 21 after diagnosis of SARS-CoV-2 infection [87]. Similar differences in the immune response of these substances have been shown after vaccination with seasonal influenza [88].



Table 4. Multiple sclerosis: serology results post-COVID-19.

Disease-Modifying Therapy	Group of Patients	Serological Response in Plasma	Antibody Class	Time after SARS-CoV-2 Infection	Ref.
Cladribine	Case report	+	Not given	3 months	[23]
	Case report	+	Not given	4 months	[24]
	Case report	–	Not given	4 months	[24]
	Case report	– + / – (?)	IgM IgG	2 months	[22]
Anti-CD-20	Case report	+	IgA IgG	10 weeks	[25]
	Case report	+	IgM IgG	3 months	[26]
	Case report	–	IgG	3 months	[27]
	2 patients	–	IgG	6–12 weeks	[28]
	5 patients	–	IgG	23–64 days	[29]
Glatiramer	2 patients	+	IgG	51–54 days	[29]
Dimethyl fumarate	2 patients	+	IgG	40–71 days	[29]
Natalizumab	1 patients	+	IgG	68 days	[29]
Teriflunomid	2 patients	+	IgG	66 days	[29]
	Case report	+	IgG anti- S1 IgG anti-N	21 days	[30]
Fingolimod	Case report	–	IgG anti S1	35 days	[30]
	Case report	+	IgG anti N		

## 7. Discussion

SARS-CoV-2, which is responsible for the pandemic that started in December 2019, is the cause of significant medical problems. Within a year, this new virus was isolated, its structure was described, both the pathogenesis of the new disease and associated symptoms were characterized, diagnostic methods were introduced, a treatment was proposed and most importantly, an effective vaccine was developed. Currently, the diagnostic standard is the PCR test, which detects the genetic material of the virus [1]. However, serological diagnostics also provides very important information, not only about the history of the disease, but also about the population immunity and the potential capability of an immune response to the administered vaccine. Serological tests are based on antibody detection against SARS-CoV-2 virus antigens, most often against the N and S1 proteins, which are characterized by the highest immunogenicity compared to other viral proteins [89]. The severe course of the disease is associated with the phenomenon of a cytokine storm in which excessive and abnormal immune responses to ongoing infection occur [4]. Based on the available data, this article focuses on characterizing the serological statuses of patients who present with neurological complications after SARS-CoV-2 infection and patients with MS who have had COVID-19. Antibodies to the SARS-CoV-2 virus, apart from the blood serum, can also be identified in the cerebrospinal fluid [17]. The available data show that despite frequent neurological complications, antibody detection is not yet used as a standard procedure. In such situations, a PCR test is performed more frequently although the current data indicate that the mechanism responsible for the development of neuro-COVID is an immune mechanism rather than direct viral neuroinvasion [17]. This difference is indicated by a negative CSF PCR test in almost all of the described cases with a single exception [16]. On the other hand, just a few studies have been conducted to assess the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the CSF. The available data indicate the presence of such antibodies, especially in patients hospitalized in the ICU [17]. The presence of

anti-SARS-CoV-2 antibodies in the CSF can be explained by damage to the BBB caused by a cytokine storm rather than by intrathecal synthesis [90]. Cases of autoimmune encephalitis during or after COVID-19 can be found in the literature. Interestingly, despite the presence of clinical and radiological symptoms, in most of the described patients' autoantibodies typical for this disease could not be identified [17,46]. This situation is similar to that of GBS and acute myelitis, which is the reason for concluding that over the course of COVID-19, the immune system is stimulated with other than the previously identified autoantigens of the nervous system, which have not been identified so far [64]. A positive 14-3-3 protein was detected in samples from a few patients, which indicates a possible initiation of the neurodegenerative process due to SARS-CoV-2 infection [17]. More data on serology related to COVID-19 can be found on patients with multiple sclerosis. From the beginning of the pandemic, it has aroused the interest of researchers whether MS patients are at risk of severe COVID-19 [31]. The available data tend to negate these concerns [91]. Many people with MS are treated with DMTs, which often cause immunosuppression and can interfere with the serological responses to both past infection and vaccination [92]. Many DMTs, such as anti-CD20 drugs, present great concern with respect to immunosuppression.

Interestingly, the production of antibodies, mainly in the IgG class, against the SARS-CoV-2 virus in patients taking these medications turned out to be the weakest [81,83]. In one study, the researchers determined the presence of positive IgA antibodies, which could be explained by the fact that ocrelizumab has a lower effect on MALT tissues than did other similar drugs [93]. Conflicting data about the serological responses can be found with cladribine. Out of four analyzed cases, three patients seroconverted, and one did not [74–76]. For other DMTs (such as: glatiramer acetate, dimethyl fumarate, natalizumab, teriflunomide) IgG seroconversion has been described [80]. Only one patient treated with fingolimod was found who was given a serology test after COVID-19 infection. This patient seroconverted slightly positive against the N protein, whereas antibodies against the S protein were negative [87]. Based on this case, it is difficult to draw conclusions regarding the entire group of patients treated with these drugs.

## 8. Conclusions

In summary, serological tests are an integral part of COVID-19 diagnostics and provide a great deal of valuable information. Up to 36% of patients with SARS-CoV-2 infection show neurological symptoms. Furthermore, with the progression of the pandemic, the range of neurological symptoms is becoming more extensive and also includes serious complications, such as autoimmune encephalitis or GBS [7,41]. However, it is not yet well understood whether these symptoms are due to direct damage to the nervous system by the virus or via the indirect consequences of an infection. The available data indicate immune pathogenesis rather than direct viral neuroinvasion [14]. Therefore, it can be concluded that in the diagnosis of such patients, antibodies to COVID-19, including those in the CSF, should be evaluated in order to understand better biological mechanisms underlying neurological manifestation of SARS-CoV-2 infection and also to confirm viral etiology. Unfortunately, this diagnostic procedure is not standard today. It is hoped that such a procedure will be included in future guidelines for neuro-COVID diagnostics. More data are available for multiple sclerosis, especially for patients treated with disease-modifying drugs. The capability of their immune systems to produce antibodies is particularly important in terms of administering preventive vaccinations in this group of patients. However, still a lack of data on the serological status of the entire group of patients with multiple sclerosis still exists. Moreover, further studies are needed to assess post-infection immunity in the population of neurological patients. As we gain more knowledge about the different ways in which COVID-19 can destroy the human body, understanding the neurological symptoms will be pivotal in helping people recover from this severe viral infection.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.K., A.K.-P., B.M. and A.K.; methodology J.K. and A.K.-P.; resources, J.K., A.K.-P., B.M. and A.K.; writing—original draft preparation, J.K.; writing—review and

editing, A.K.-P., B.M. and A.K.; supervision, B.M. and A.K.; project administration, J.K. and A.K.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** BM received consultation and/or lecture honoraria from Abbott, Wiener, Roche, Cormay and Biameditek. AKP received a consultation honorarium from Roche company.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interests.

## References

- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [CrossRef] [PubMed]
- Coronavirus Update (Live): 102,061,812 Cases and 2,201,477 Deaths from COVID-19 Virus Pandemic-Worldometer. Available online: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (accessed on 30 April 2021).
- Assadial, S.; Fatahi, Y.; Zavvar, M.; Nicknam, M.H. COVID-19: Significance of antibodies. *Hum. Antibodies* **2020**, *28*, 287–297. [CrossRef] [PubMed]
- Li, G.; Fan, Y.; Lai, Y.; Han, T.; Li, Z.; Zhou, P.; Pan, P.; Wang, W.; Hu, D.; Liu, X.; et al. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 424432. [CrossRef]
- Graham, R.L.; Donaldson, E.F.; Baric, R.S. A decade after SARS: Strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 836–848. [CrossRef]
- Alhazzani, W.; Møller, M.H.; Arabi, Y.M.; Loeb, M.; Gong, M.N.; Fan, E. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**. [CrossRef]
- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**. [CrossRef]
- Bhatt, P.J.; Shiao, S.; Brunetti, L.; Xie, Y.; Solanki, K.; Khalid, S.; Mohayya, S.; Au, P.H.; Pham, C.; Uprety, P.; et al. Risk Factors and Outcomes of Hospitalized Patients with Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Secondary Bloodstream Infections: A Multicenter Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, C.; Chen, X.; Cai, Y.; Zhou, X.; Xu, S.; Huang, H.; Zhang, L.; Zhou, X.; Du, C.; Zhang, Y.; et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* **2020**. [CrossRef]
- Zhang, L.; Jackson, C.B.; Mou, H.; Ojha, A.; Rangarajan, E.S.; Izard, T.; Farzan, M.; Choe, H. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–9. [CrossRef]
- Diagnosis and treatment plan of Corona Virus Disease 2019 (tentative sixth edition). *Glob. Health J.* **2020**. [CrossRef]
- Zhao, J.; Yuan, Q.; Wang, H.; Liu, W.; Liao, X.; Su, Y.; Wang, X.; Yuan, J.; Li, T.; Li, J. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [CrossRef]
- Zhang, B.; Zhou, X.; Zhu, C.; Song, Y.; Feng, F.; Qiu, Y.; Feng, J.; Jia, Q.; Song, Q.; Zhu, B.; et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **2020**. [CrossRef]
- Yachou, Y.; El Idrissi, A.; Belapasov, V.; Ait Benali, S. Neuroinvasion, neurotropic, and neuroinflammatory events of SARS-CoV-2: Understanding the neurological manifestations in COVID-19 patients. *Neurol. Sci.* **2020**, *41*, 2657–2669. [CrossRef]
- Zhou, Z.; Kang, H.; Li, S.; Zhao, X. Understanding the neurotropic characteristics of SARS-CoV-2: From neurological manifestations of COVID-19 to potential neurotropic mechanisms. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 2179–2184. [CrossRef] [PubMed]
- Moriguchi, T.; Harii, N.; Goto, J.; Harada, D.; Sugawara, H.; Takamino, J.; Ueno, M.; Sakata, H.; Kondo, K.; Myose, N.; et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *94*, 55–58. [CrossRef]
- Alexopoulos, H.; Magira, E.; Bitzogli, K.; Kafasi, N.; Vlachoyiannopoulos, P.; Tzioufas, A.; Kotanidou, A.; Dalakas, M.C. Anti-SARS-CoV-2 antibodies in the CSF, blood-brain barrier dysfunction, and neurological outcome Studies in 8 stuporous and comatose patients. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2020**, *7*, 893. [CrossRef]
- Kreye, J.; Reincke, S.M.; Prüss, H. Do cross-reactive antibodies cause neuropathology in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 645–646. [CrossRef]
- Capasso, N.; Palladino, R.; Montella, E.; Pennino, F.; Lanzillo, R.; Carotenuto, A.; Petracca, M.; Iodice, R.; Iovino, A.; Aruta, F.; et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Multiple Sclerosis: The Hidden Part of the Iceberg. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 4066. [CrossRef]
- Chowdhury, M.A.; Hossain, N.; Kashem, M.A.; Shahid, M.A.; Alam, A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 1619–1629. [CrossRef] [PubMed]
- Melenotte, C.; Silvin, A.; Goubet, A.G.; Lahmar, I.; Dubuisson, A.; Zumla, A.; Raoult, D.; Merad, M.; Gachot, B.; Hénon, C.; et al. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncimmunology* **2020**, *9*. [CrossRef] [PubMed]

22. Zarrilli, G.; Angerilli, V.; Businello, G.; Sbaraglia, M.; Traverso, G.; Fortarezza, F.; Rizzo, S.; Gaspari, M.D.; Basso, C.; Calabrese, F.; et al. The Immunopathological and Histological Landscape of COVID-19-Mediated Lung Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 974. [CrossRef] [PubMed]
23. Flisiak, R.; Parczewski, M.; Horban, A.; Jaroszewicz, J.; Kozielowicz, D.; Pawłowska, M.; Piekarska, A.; Simon, K.; Tomasiewicz, K.; Zarebska-Michaluk, D. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the polish association of epidemiologists and infectiologists. Annex no. 2 as of October 13, 2020. *Polish Arch. Intern Med.* **2020**, *130*, 915–918. [CrossRef] [PubMed]
24. Wong, N.A.; Saier, M.H. The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1308. [CrossRef]
25. Tan, L.; Wang, Q.; Zhang, D.; Ding, J.; Huang, Q.; Tang, Y.Q.; Wang, Q.; Miao, H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: A descriptive and predictive study. *Signal Transduct. Target Ther.* **2020**, *5*, 1–3. [CrossRef]
26. Mehta, P.; McAuley, D.F.; Brown, M.; Sanchez, E.; Tattersall, R.S.; Manson, J.J. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **2020**, *395*, 1033–1034. [CrossRef]
27. Maggi, E.; Walter Canonica, G.; Moretta, L. COVID-19: Unanswered questions on immune response and pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**. [CrossRef]
28. WIESŁAW WIKTOR JEDRZEJCZAK: Limfocytytoza Hemofagocytyarna–Rzadko Rozpoznawany Uleczalny Stan Bezpośredniego Zagrożenia Życia Występujący Również u Dorosłych. Available online: [http://pthit.pl/Acta\\_Haematologica\\_Polonica,Choroby\\_histiocytow\\_Cytokiny\\_Wirus\\_Epsteina\\_Barr,406.html](http://pthit.pl/Acta_Haematologica_Polonica,Choroby_histiocytow_Cytokiny_Wirus_Epsteina_Barr,406.html) (accessed on 31 January 2021).
29. Tomasiewicz, K.; Piekarska, A.; Stempkowska-Rejek, J.; Serafińska, S.; Gawkowska, A.; Parczewski, M.; Niścigorska-Olsen, J.; Łapiński, T.W.; Zarebska-Michaluk, D.; Kowalska, J.D.; et al. Tocilizumab for patients with severe COVID-19: A retrospective, multi-centre study. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2020**, *19*. [CrossRef]
30. Bastos, M.L.; Tavaziva, G.; Abidi, S.K.; Campbell, J.R.; Haraoui, L.P.; Johnston, J.C.; Lan, Z.; Law, S.; MacLean, E.; Trajman, A.; et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2020**, *370*, 2516. [CrossRef]
31. Bond, K.; Williams, E.; Howden, B.P.; Williamson, D.A. Serological tests for COVID-19. *Med. J. Aust.* **2020**, *213*, 397–399. [CrossRef]
32. McAndrews, K.M.; Dowlathshahi, D.P.; Dai, J.; Becker, L.M.; Hensel, J.; Snowden, L.M.; Leveille, J.M.; Brunner, M.R.; Holden, K.W.; Hopkins, N.S.; et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight* **2020**, *5*. [CrossRef]
33. Li, K.; Huang, B.; Wu, M.; Zhong, A.; Li, L.; Cai, Y.; Wang, Z.; Wu, L.; Zhu, M.; Li, J.; et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–11. [CrossRef]
34. Padoan, A.; Sciacovelli, L.; Basso, D.; Negrini, D.; Zuin, S.; Cosma, C.; Faggian, D.; Matricardi, P.; Plebani, M. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *507*, 164–166. [CrossRef]
35. Guo, C.C.; Mi, J.Q.; Nie, H. Seropositivity rate and diagnostic accuracy of serological tests in 2019-nCoV cases: A pooled analysis of individual studies. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2020**, *24*, 10208–10218. [CrossRef] [PubMed]
36. Diagnostic Performance of COVID-19 Serology Assays-PubMed. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32342927/> (accessed on 31 January 2021).
37. Long, Q.X.; Liu, B.Z.; Deng, H.J.; Wu, G.C.; Deng, K.; Chen, Y.K.; Liao, P.; Qiu, J.F.; Lin, Y.; Cai, X.F.; et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 845–848. [CrossRef] [PubMed]
38. Wan, Y.; Shang, J.; Sun, S.; Tai, W.; Chen, J.; Geng, Q.; He, L.; Chen, Y.; Wu, J.; Shi, Z.; et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J. Virol.* **2019**, *94*. [CrossRef]
39. Song, E.; Zhang, C.; Israelow, B.; Lu-Culligan, A.; Prado, A.V.; Skriabine, S.; Lu, P.; Weizman, O.E.; Liu, F.; Dai, Y.; et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* **2021**, *218*. [CrossRef]
40. Buzhdygan, T.P.; DeOre, B.J.; Baldwin-Leclair, A.; Bullock, T.A.; McGary, H.M.; Khan, J.A.; Razmpour, R.; Hale, J.F.; Galie, P.A.; Potula, R.; et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *146*, 105131. [CrossRef] [PubMed]
41. Al Saiegh, F.; Ghosh, R.; Leibold, A.; Avery, M.B.; Schmidt, R.F.; Theofanis, T.; Mouchtouris, N.; Philipp, L.; Peiper, S.C.; Wang, Z.X.; et al. Status of SARS-CoV-2 in cerebrospinal fluid of patients with COVID-19 and stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2020**, *91*, 846–848. [CrossRef]
42. Neumann, B.; Schmidbauer, M.L.; Dimitriadis, K.; Otto, S.; Knier, B.; Niesen, W.D.; Hosp, J.A.; Günther, A.; Lindemann, S.; Nagy, G.; et al. Cerebrospinal fluid findings in COVID-19 patients with neurological symptoms. *J. Neurol. Sci.* **2020**, *418*, 117090. [CrossRef] [PubMed]
43. Destras, G.; Bal, A.; Escuret, V.; Morfin, F.; Lina, B.; Josset, L. Systematic SARS-CoV-2 screening in cerebrospinal fluid during the COVID-19 pandemic. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e149. [CrossRef]
44. Domingues, R.B.; Mendes-Correa, M.C.; de Moura Leite, F.B.V.; Sabino, E.C.; Salarini, D.Z.; Claro, I.; Santos, D.W.; de Jesus, J.G.; Ferreira, N.E.; Romano, C.M.; et al. First case of SARS-COV-2 sequencing in cerebrospinal fluid of a patient with suspected demyelinating disease. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 3154–3156. [CrossRef]
45. Andriuta, D.; Roger, P.A.; Thibault, W.; Toublanc, B.; Sauzay, C.; Castelain, S.; Godefroy, O.; Brochet, E. COVID-19 encephalopathy: Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in CSF. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 2810–2811. [CrossRef]

46. Franke, C.; Ferse, C.; Kreye, J.; Reincke, S.M.; Sanchez-Sendin, E.; Rocco, A.; Steinbrenner, M.; Angermair, S.; Treskatsch, S.; Zickler, D.; et al. High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in COVID-19 patients with neurological symptoms. *Brain Behav. Immun.* **2021**. [[CrossRef](#)]
47. de Antonio, R.; Suárez, G.; Barriuso, F.; Pérez, R. Para-infectious anti-GD2/GD3 IgM myelitis during the Covid-19 pandemic: Case report and literature review. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, *49*, 102783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Águila-Gordo, D.; Flores-Barragán, J.M.; Ferragut-Lloret, E.; Portela-Gutierrez, J.; LaRosa-Salas, B.; Porras-Leal, L.; Guzmán, J.C.V. Acute myelitis and SARS-CoV-2 infection. A new etiology of myelitis? *J. Clin. Neurosci.* **2020**, *80*, 280–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Armangue, T.; Spatola, M.; Vlasea, A.; Mattozzi, S.; Cárceles-Cordon, M.; Martínez-Heras, E.; Llufríu, S. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: A prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 760–772. [[CrossRef](#)]
50. Prüss, H. Postviral autoimmune encephalitis: Manifestations in children and adults. *Curr. Opin. Neurol.* **2017**, *30*, 327–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hoffman, L.A.; Vilensky, J.A. Encephalitis lethargica: 100 years after the epidemic. *Brain* **2017**, *140*, 2246–2251. [[CrossRef](#)]
52. Matschke, J.; Lütgehetmann, M.; Hagel, C.; Spherhake, J.P.; Schröder, A.S.; Edler, C.; Mushumba, H.; Fitzek, A.; Allweiss, L.; Dandri, M.; et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: A post-mortem case series. *Lancet Neurol.* **2020**, *19*, 919–929. [[CrossRef](#)]
53. Tuma, R.L.; Guedes, B.F.; Carra, R.; Iepsen, B.; Rodrigues, J.; Camelo-Filho, A.E.; Kubota, G.; Ferrari, M.; Studart-Neto, A.; Oku, M.H.; et al. Clinical, cerebrospinal fluid, and neuroimaging findings in COVID-19 encephalopathy: A case series. *Neurol. Sci.* **2021**, *42*. [[CrossRef](#)]
54. Farhadian, S.; Glick, L.R.; Vogels, C.B.F.; Thomas, J.; Chiarella, J.; Casanovas-Massana, A.; Zhou, J.; Odio, C.; Vijayakumar, P.; Geng, B.; et al. Acute encephalopathy with elevated CSF inflammatory markers as the initial presentation of COVID-19. *BMC Neurol.* **2020**, *20*, 248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Espíndola, O.M.; Brandão, C.O.; Gomes, Y.C.P.; Siqueira, M.; Soares, C.N.; Lima, M.A.S.D.; Leite, A.C.C.B.; Torezani, G.; Araujo, A.Q.C.; Silva, M.T.T. Cerebrospinal fluid findings in neurological diseases associated with COVID-19 and insights into mechanisms of disease development. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *102*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mondal, R.; Ganguly, U.; Deb, S.; Shome, G.; Pramanik, S.; Bandyopadhyay, D.; Lahiri, D. Meningoencephalitis associated with COVID-19: A systematic review. *J. Neurovirol.* **2020**, *1*, 1. [[CrossRef](#)]
57. Ye, M.; Ren, Y.; Lv, T. Encephalitis as a clinical manifestation of COVID-19. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *88*, 945–946. [[CrossRef](#)]
58. Panariello, A.; Bassetti, R.; Radice, A.; Rossotti, R.; Puoti, M.; Corradin, M.; Moreno, M.; Percudani, M. Anti-NMDA receptor encephalitis in a psychiatric Covid-19 patient: A case report. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *87*, 179–181. [[CrossRef](#)]
59. Monti, G.; Giovannini, G.; Marudi, A.; Bedin, R.; Melegari, A.; Simone, A.M.; Santangelo, M.; Pignatti, A.; Bertellini, E.; Trenti, T.; et al. Anti-NMDA receptor encephalitis presenting as new onset refractory status epilepticus in COVID-19. *Seizure* **2020**, *81*, 18–20. [[CrossRef](#)]
60. Sarma, D.; Bilello, L. A Case Report of Acute Transverse Myelitis Following Novel Coronavirus Infection. *Clin. Pract. Cases Emerg. Med.* **2020**, *4*, 321–323. [[CrossRef](#)]
61. Immunopathogenesis of Acute Transverse Myelitis: Current Opinion in Neurology. Available online: [https://journals.lww.com/co-neurology/Citation/2002/06000/Immunopathogenesis\\_of\\_acute\\_transverse\\_myelitis.19.aspx](https://journals.lww.com/co-neurology/Citation/2002/06000/Immunopathogenesis_of_acute_transverse_myelitis.19.aspx) (accessed on 6 February 2021).
62. Munz, M.; Wessendorf, S.; Koretsis, G.; Tewald, F.; Baegi, R.; Krämer, S.; Geissler, M.; Reinhard, M. Acute transverse myelitis after COVID-19 pneumonia. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 2196–2197. [[CrossRef](#)]
63. AlKetbi, R.; AlNuaimi, D.; AlMulla, M.; AlTalal, N.; Samir, M.; Kumar, N.; AlBastaki, U. Acute myelitis as a neurological complication of Covid-19: A case report and MRI findings. *Radiol Case Reports.* **2020**, *15*, 1591–1595. [[CrossRef](#)]
64. Abu-Rumeileh, S.; Abdelhak, A.; Foschi, M.; Tumani, H.; Otto, M. Guillain-Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: An up-to-date systematic review of 73 cases. *J. Neurol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
65. Dufour, C.; Co, T.-K.; Liu, A. GMI Ganglioside Antibody and COVID-19 related Guillain Barre Syndrome—A Case Report, Systemic Review and Implication for Vaccine Development. *Brain, Behav. Immun. Health* **2021**, *12*, 100203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Willison, H.J.; Jacobs, B.C.; van Doorn, P.A. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* **2016**, *388*, 717–727. [[CrossRef](#)]
67. Trujillo Gittermann, L.M.; Valenzuela Feris, S.N.; von Oetinger Giacoman, A. Relation between COVID-19 and Guillain-Barré syndrome in adults. Systematic review. *Neurologia* **2020**, *35*, 646–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Hasan, I.; Saif-Ur-Rahman, K.M.; Hayat, S.; Papri, N.; Jahan, I.; Azam, R.; Ara, G.; Islam, Z. Guillain-Barrésyndrome associated with SARS-CoV-2 infection: A systematic review and individual participant data meta-analysis. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2020**, *25*, 335–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Llorente Ayuso, L.; Torres Rubio, P.; Beijinho do Rosário, R.F.; Giganto Arroyo, M.L.; Sierra-Hidalgo, F. Bickerstaff encephalitis after COVID-19. *J. Neurol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
70. Khoo, A.; McLoughlin, B.; Cheema, S.; Weil, R.S.; Lambert, C.; Manji, H.; Zandi, M.S.; Morrow, J.M. Postinfectious brainstem encephalitis associated with SARS-CoV-2. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2020**, *91*, 1013–1014. [[CrossRef](#)]
71. Baker, D.; Amor, S.; Kang, A.S.; Schmierer, K.; Giovannoni, G. The underpinning biology relating to multiple sclerosis disease modifying treatments during the COVID-19 pandemic. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *43*, 102174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Salmi, A.; Ziola, B.; Hovi, T.; Reunanen, M. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **1982**, *32*, 292–295. [[CrossRef](#)]

73. Comi, G.; Cook, S.; Giovannoni, G.; Rieckmann, P.; Sørensen, P.S.; Vermersch, P.; Galazka, A.; Nolting, A.; Hicking, C.; Dangond, F. Effect of cladribine tablets on lymphocyte reduction and repopulation dynamics in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2019**, *29*, 168–174. [[CrossRef](#)]
74. Celius, E.G. Normal antibody response after COVID-19 during treatment with cladribine. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *46*, 102476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Preziosa, P.; Rocca, M.A.; Nozzolillo, A.; Moiola, L.; Filippi, M. COVID-19 in cladribine-treated relapsing-remitting multiple sclerosis patients: A monocentric experience. *J. Neurol.* **2020**, *1*, 3. [[CrossRef](#)]
76. Gelibter, S.; Orrico, M.; Filippi, M.; Moiola, L. COVID-19 with no antibody response in a multiple sclerosis patient treated with cladribine: Implication for vaccination program? *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, *49*, 102775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Bar-Or, A.; Calkwood, J.C.; Chognot, C.; Evershed, J.; Fox, E.J.; Herman, A.; Manfrini, M.; McNamara, J.; Robertson, D.S.; Stokmaier, D.; et al. Effect of ocrelizumab on vaccine responses in patients with multiple sclerosis: The VELOCE study. *Neurology* **2020**, *95*, e1999–e2008. [[CrossRef](#)]
78. Lucchini, M.; Bianco, A.; Del Giacomo, P.; De Fino, C.; Nociti, V.; Mirabella, M. Is serological response to SARS-CoV-2 preserved in MS patients on ocrelizumab treatment? A case report. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *44*, 102323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Boyaka, P.N. Inducing Mucosal IgA: A Challenge for Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Maillart, E.; Papeix, C.; Lubetzki, C.; Roux, T.; Pourcher, V.; Louapre, C. Beyond COVID-19: DO MS/NMO-SD patients treated with anti-CD20 therapies develop SARS-CoV2 antibodies? *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *46*. [[CrossRef](#)]
81. Thornton, J.R.; Harel, A. Negative SARS-CoV-2 antibody testing following COVID-19 infection in Two MS patients treated with ocrelizumab. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *44*, 102341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Conte, W.L. Attenuation of antibody response to SARS-CoV-2 in a patient on ocrelizumab with hypogammaglobulinemia. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *44*, 102315. [[CrossRef](#)]
83. Zabalza, A.; Cárdenas-Robledo, S.; Tagliani, P.; Arrambide, G.; Otero-Romero, S.; Carbonell-Mirabent, P.; Rodríguez-Barranco, M.; Rodríguez-Acevedo, B.; Restrepo Vera, J.L.; Resina-Salles, M.; et al. COVID-19 in multiple sclerosis patients: Susceptibility, severity risk factors and serological response. *Eur. J. Neurol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
84. Milo, R. Ofatumumab—A Potential Subcutaneous B-cell Therapy for Relapsing Multiple Sclerosis. *Eur. Neurol. Rev.* **2020**, *15*, 27–35. [[CrossRef](#)]
85. Flores-Gonzalez, R.E.; Hernandez, J.; Tornos, L.; Rammohan, K.; Delgado, S. Development of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in a relapsing multiple sclerosis patient on ofatumumab. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, *49*. [[CrossRef](#)]
86. Chan, A.; De Seze, J.; Comabella, M. Teriflunomide in Patients with Relapsing-Remitting Forms of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2016**, *30*, 41–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Luca, B.; Tommaso, G.; Bavaro, D.F.; Laura, M.; Annalisa, S.; Gioacchino, A.; Damiano, P.; Maria, T.; Pietro, I. Seroconversion and indolent course of COVID-19 in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod and teriflunomide. *J. Neurol. Sci.* **2020**, *416*, 117011. [[CrossRef](#)]
88. Bar-Or, A.; Freedman, M.S.; Kremenutzky, M.; Menguy-Vacheron, F.; Bauer, D.; Jodl, S.; Truffinet, P.; Benamor, M.; Chambers, S.; O'Connor, P.W. Teriflunomide effect on immune response to influenza vaccine in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **2013**, *81*, 552–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Okba, N.M.A.; Muller, M.A.; Li, W. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
90. Iadecola, C.; Anrather, J.; Kamel, H. Effects of COVID-19 on the Nervous System. *Cell* **2020**, *183*, 16–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Berger, J.R.; Brandstadter, R.; Bar-Or, A. COVID-19 and MS disease-modifying therapies. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2020**, *7*, 761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Louapre, C.; Collongues, N.; Stankoff, B.; Giannesini, C.; Papeix, C.; Bensa, C.; Deschamps, R.; Créange, A.; Wahab, A.; Pelletier, J.; et al. Clinical Characteristics and Outcomes in Patients with Coronavirus Disease 2019 and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **2020**, *77*, 1079–1088. [[CrossRef](#)]
93. Baker, D.; Roberts, C.A.K.; Pryce, G.; Kang, A.S.; Marta, M.; Reyes, S.; Schmierer, K.; Giovannoni, G.; Amor, S. COVID-19 vaccine-readiness for anti-CD20-depleting therapy in autoimmune diseases. *Clin. Exp Immunol.* **2020**, *202*, 149–161. [[CrossRef](#)]

## 12. Publikacja 2.



This Research Paper is accompanied  
by Invited Editorial, see page 11


RESEARCH PAPER

Neurologia i Neurochirurgia Polska  
Polish Journal of Neurology and Neurosurgery  
2023, Volume 57, no. 1, pages: 121–130  
DOI: 10.5603/PJNNS.a2022.0067  
Copyright © 2023 Polish Neurological Society  
ISSN: 0028-3843, e-ISSN: 1897-4260

LEADING TOPIC

Leading Topic Editor: Alina Kułakowska, MD, PhD, Department of Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

# Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies

Joanna Kulikowska<sup>1</sup> , Agata Czarnowska<sup>1</sup>, Monika Gudowska-Sawczuk<sup>2</sup>,  
Agnieszka Kulczyńska-Przybik<sup>2</sup>, Marcin Bazylewicz<sup>1</sup>, Francois Collins<sup>3</sup>, Monika Chorąży<sup>1</sup>,  
Barbara Mroczko<sup>2</sup>, Jan Kochanowicz<sup>2</sup>, Katarzyna Kapica-Topczewska<sup>1</sup>, Alina Kułakowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>2</sup>Department of Neurodegeneration Diagnostics, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>3</sup>Independent statistical consultant

### ABSTRACT

**Clinical rationale for the study.** The course of COVID-19 in people with multiple sclerosis (PwMS) has been described, while the serological status after SARS-CoV-2 infection or vaccination, especially in patients treated with disease-modifying therapies (DMT), is still under investigation. This is a significant clinical problem, as certain DMTs may predispose to a severe course of viral infections.

**Aim of the study.** We analyzed the presence of antibodies against spike (S) and nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2 in relapsing-remitting PwMS treated with DMT, especially dimethyl fumarate, interferon beta, and glatiramer acetate, in a single multiple sclerosis (MS) centre in north-eastern Poland (the Department of Neurology, Medical University of Białystok).

**Material and methods.** The presence of antibodies against S and N proteins in PwMS was assessed twice: on visit one (between May and June 2020) (n = 186) and on visit two (between May and June 2021) (n = 88). Samples were taken from 68 individuals on both visits. Demographic and clinical data was collected: duration of MS, Expanded Disability Status Scale Score (EDSS), type of DMT, history of COVID-19 (positive PCR or antigen test in the past), vaccination status, and the type of vaccine.

**Results.** It was shown that on visit one: 3.7% (n = 7) PwMS were positive for IgA against S protein (IgA-S), 3.2% (n = 6) for IgG against S (IgG-S) protein, and none of those examined was positive for IgG against N protein (IgG-N). On visit two, the most common detected antibodies were IgG-S (71.3%; n = 62), then IgA-S (65.1%; n = 55), and the least common was IgG-N (18.2%; n = 16). On visit two: 20.45% of PwMS had a history of a positive SARS-CoV-2 PCR or antigen test during the last year. By the time of visit two, 42.05% (n = 37) of patients who participated in visit two had been full-course vaccinated against COVID-19. It was demonstrated that vaccination against SARS-CoV-2 significantly induces the production of IgG-S and IgA-S (p < 0.0001), while no difference between vaccinated and unvaccinated patients was shown in the detection of IgG-N. There was no correlation between COVID-19 infection and antibodies against proteins S and N in the study group. Moreover, the presented study did not show any relationship between the ability to produce antibodies against the S protein with any of the used DMTs.

**Conclusions and clinical implications.** According to our study, PwMS treated with dimethyl fumarate, interferon beta, or glatiramer acetate can efficiently produce antibodies against SARS-CoV-2 both after infection and after vaccination.

**Key words:** COVID-19, SARS-CoV-2, multiple sclerosis, disease-modifying therapies, antibodies, vaccines, serology

(*Neurol Neurochir Pol* 2023; 57 (1): 121–130)

Address for correspondence: Joanna Kulikowska, Department of Neurology, Medical University of Białystok, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok, Poland; e-mail:joannaakulikowska@gmail.com

Received: 29.08.2022 Accepted: 19.10.2022 Early publication date: 24.11.2022

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.



www.journals.viamedica.pl/neurologia\_neurochirurgia\_polska

121

## Introduction

The coronavirus disease (COVID-19) pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was announced by the World Health Organisation on 11 March, 2020 [1]. In COVID-19 diagnostics, molecular (real-time polymerase chain reaction; RT-PCR) and serological tests to detect specific antibodies against the virus are used [2].

Since the introduction of vaccines against COVID-19, the assessment of antibodies against SARS-CoV-2 is a highly important element of a post-vaccine immune response evaluation. SARS-CoV-2 belongs to the beta-coronavirus group, and is one of the five pathogenic human coronaviruses. The virus is made up of the following proteins: spike protein (S), membrane protein (M), envelope protein (E), and nucleocapsid protein (N). The virus uses angiotensin-converting enzyme (ACE) receptors, which are present in many human organs, to penetrate the host cells.

The element of the S protein: S1 subunit – the receptor-binding domain (RBD) binds to the ACE receptor, which leads to cell infection [3]. The antibodies against the S protein have neutralising properties. Antibodies against N protein do not have neutralising properties, but indicate a past infection [4, 5]. The SARS-CoV-2 virus attacks the mucous membranes. Therefore, the production of IgA starts early and persists for about two months after infection. IgG antibodies are detectable c.14 days after the infection and are present for at least a few months [4, 6]. The sensitivity of IgG detection after at least 14 days from the onset of COVID-19 is 100% for the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Chemiluminescent Immunoassay (CLIA), and Lateral Flow Immunoassay (LFIA) methods [7]. Current reports indicate that the cumulative assessment of anti-S antibodies and anti-N protein antibodies, assessed in two classes of immunoglobulins (IgG and IgA), constitute both a sensitive and specific serological diagnostic approach to SARS-CoV-2 infection [8].

Multiple sclerosis (MS), as a chronic autoimmune disease of the central nervous system, may, under certain circumstances, predispose to a more severe course of COVID-19 [9]. In MS pathogenesis, activation of circulating T and B lymphocytes and excessive production of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-17, IL-6) plays an important role [10]. In treating MS, immunomodulatory and immunosuppressive medications (disease-modifying therapies or DMTs) are used [11]. Certain DMTs may predispose to the development of viral infections and worsen the prognosis [9, 12]. On the other hand, studies evaluating the course of COVID-19 in people with MS (PwMS), including those treated with DMTs, have indicated a relatively mild course of infection in most cases [13, 14].

## Clinical rationale for study

To the best of our knowledge, no analysis of antibodies against the SARS-CoV-2 protein (S and N) has been carried

out in north-eastern Poland or indeed north-eastern Europe. Moreover, the current literature does not provide data on the presence of antibodies as well against N and S proteins in other MS populations.

Here we assess the presence of anti-S antibodies in class IgG (IgG-S), IgA (IgA-S), and anti-N protein antibodies in class IgG (IgG-N) in PwMS treated with different DMTs in a single MS centre in north-eastern Poland i.e. the Department of Neurology, Medical University of Białystok (MUB).

## Material and methods

### Study group

PwMS who had the relapsing-remitting course of disease (RR PwMS) diagnosed according to the McDonald's 2010 and 2017 criteria, and who were being treated with DMTs at the Department of Neurology, MUB, were included in this study. Blood samples were collected during two routine visits to the MS centre. The first visit (visit 1) was between May and June 2020, and the second one (visit 2) one year later, between May and June 2021. 186 patients participated in visit 1, 88 patients participated in visit 2, and 68 individuals took part in both visits. On each visit, the following survey data was collected: duration of MS, Expanded Disability Status Scale score (EDSS), type of used DMT, COVID-19 history (positive PCR or antigen test in the past), vaccination against SARS-CoV-2 status, and the type of used vaccine against COVID-19. During both visits, each study participant was examined by a neurologist. All individuals signed informed consent to participate in this study. The study was approved (approval No. APK.002.230.2020) by the Bioethics Committee at the Medical University of Białystok, Poland. The clinical characteristics of the study group are set out in Table 1.

### Laboratory tests

Assessment of antibodies against the SARS-CoV-2 virus was conducted: IgG-S, IgA-S, IgG-N. Serum levels of the IgG-S and IgA-S antibodies were assessed with the ELISA using the anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG kits (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Germany) adhering to the manufacturer's instructions. The results were assessed semi-quantitatively by calculating the value of the ratio of the extinction of the person sample to the extinction of the calibrator. Results were interpreted according to the manufacturer's recommendation: ratio values < 0.8 were considered negative,  $\geq 0.8$  to < 1.1 as borderline, and  $\geq 1.1$  as positive.

Serum levels of the IgG antibodies against the N protein of the SARS-CoV-2 were measured by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) on the automatic Alinity system (Abbott, Chicago, IL, USA). The obtained chemiluminescent reaction was assessed as relative light units (RLU). The level of serum antibodies was directly proportional to the RLU detected by the system optics. The S/C (serum/cut-off)



**Table 1.** Study group characteristics

Group visit 1					
DMT	DMF (n = 79)	INF (n = 49)	GA (n = 37)	Other* (n = 21)	All (n = 186)
<b>Sex</b>					
Female	67.09% (n = 53)	63.27% (n = 31)	62.16% (n = 23)	80.95% (n = 17)	66.67% (n = 124)
Male	32.91% (n = 26)	36.73% (n = 18)	37.83% (n = 14)	19.05% (n = 4)	33.33% (n = 62)
<b>Age</b>					
Mean	38	46	45	44	42
SD	10.5	12.2	12.4	13.7	12.1
<b>MS duration</b>					
Mean	8.6	9.0	9.1	10.0	9.0
SD	5.79	5.41	6.39	5.72	5.78
<b>EDSS</b>					
Mean	1.6	1.8	2.5	2.5	1.9
SD	1.18	1.01	1.17	1.62	1.25
Group visit 2					
DMT	DMF (n = 29)	INF (n = 34)	GA (n = 18)	Other** (n = 7)	All (n = 88)
<b>Sex</b>					
Female	58.62% (n = 17)	67.65% (n = 23)	44.44% (n = 8)	71.42% (n = 5)	60.23% (n = 53)
Male	41.38% (n = 12)	32.35% (n = 11)	55.56% (n = 10)	28.57% (n = 2)	39.77% (n = 35)
<b>Age</b>					
Mean	37	42	45	48	41
SD	10.1	12.1	11.6	8.5	11.5
<b>MS duration</b>					
Mean	6.5	7.6	10.4	9.1	8.0
SD	6.03	5.00	9.31	6.82	6.59
<b>EDSS</b>					
Mean	1.5	1.8	2.3	2.6	1.8
SD	1.26	1.10	1.23	1.88	1.28
<b>History of COVID-19</b>					
Yes	13.79% (n = 4)	17.65% (n = 6)	33.33% (n = 6)	28.57% (n = 2)	20.45% (n = 18)
No	86.21% (n = 25)	79.41% (n = 27)	66.67% (n = 12)	71.43% (n = 5)	78.41% (n = 69)
Questionable	0% (n = 0)	2.94% (n = 1)	0% (n = 0)	0% (n = 0)	1.14% (n = 1)
<b>Vaccine against COVID-19 (full vaccine course)</b>					
None	58.62% (n = 17)	58.82% (n = 20)	61.11% (n = 11)	42.86% (n = 3)	57.95% (n = 51)
Pfizer (2 doses)	31.03% (n = 9)	29.41% (n = 10)	33.33% (n = 6)	28.57% (n = 2)	30.68% (n = 27)
Astra Zeneca (2 doses)	3.45% (n = 1)	2.94% (n = 1)	0% (n = 0)	28.57% (n = 2)	4.55% (n = 4)
Moderna (2 doses)	3.45% (n = 1)	8.82% (n = 3)	5.56% (n = 1)	0% (n = 0)	5.68% (n = 5)
Johnson & Johnson (1 dose)	3.45 (n = 1)	0%(n = 0)	0% (n = 0)	0% (n = 0)	1.14% (n = 1)
Group visit 1 + 2					
DMT	DMF (n = 23)	INF (n = 26)	GA (n = 15)	Other*** (n = 4)	All (n = 68)
<b>Sex</b>					
Female	17.39% (n = 14)	65.38% (n = 17)	46.67% (n = 7)	75.00% (n = 3)	60.29% (n = 41)
Male	39.13% (n = 9)	34.62% (n = 9)	56.33% (n = 8)	25.00% (n = 1)	39.71% (n = 27)

Table 1. cont. Study group characteristics

	Group visit 1				
<b>Age</b>					
Mean	37	43	46	52	42
SD	9.7	12.6	10.4	8.2	11.5
<b>MS duration</b>					
Mean	6.7	8.7	10.2	4.2	8.1
SD	5.24	4.69	7.49	2.63	5.65
<b>EDSS</b>					
Mean	1.3	1.8	2.6	1.2	1.8
SD	1.27	0.92	1.18	0.96	1.18
<b>History of COVID-19</b>					
Yes	4.35% (n = 1)	19.23% (n = 5)	33.33% (n = 5)	50.00% (n = 2)	19.12% (n = 13)
No	95.65% (n = 22)	76.92% (n = 20)	66.67% (n = 10)	50.00% (n = 2)	79.41% (n = 54)
Questionable	0.00% (n = 0)	3.85% (n = 1)	0.00% (n = 0)	0.00% (n = 0)	4.47% (n = 1)
<b>Vaccine (full vaccine course)</b>					
None	52.17% (n = 12)	46.15% (n = 12)	53.33% (n = 8)	25.00% (n = 1)	48.53% (n = 33)
Pfizer (2 doses)	34.78% (n = 8)	38.46% (n = 10)	40.00% (n = 6)	25.00% (n = 1)	36.76% (n = 25)
Astra Zeneca (2 doses)	4.35% (n = 1)	3.85% (n = 1)	0.00% (n = 0)	50.00% (n = 2)	5.88% (n = 4)
Moderna (2 doses)	4.35% (n = 1)	11.54% (n = 3)	6.67% (n = 1)	0.00% (n = 0)	7.35% (n = 5)
Johnson&Johnson (1 dose)	4.35% (n = 1)	0.00% (n = 0)	0.00% (n = 0)	0.00% (n = 0)	1.47% (n = 1)

Group visit 1 — patients participated in first visit; group visit 2 — patients participated in second visit; group visit 1 + 2 — patients participated in both first and second visits; DMT — disease-modifying therapy; DMF — dimethyl fumarate; INF — interferon; GA — glatiramer acetate; MS — multiple sclerosis; EDSS — Expanded Disability Status Scale; SD — standard deviation; yes — positive antigen/PCR test in past; no — no positive antigen/PCR test in past

\*other: teriflunomide (n = 11); fingolimod (n = 5); cladribine (n = 3); natalizumab (n = 2) \*\*other: teriflunomide (n = 5); fingolimod (n = 1); cladribine (n = 1) \*\*\*other: teriflunomide (n = 4)

index was determined based on the above relationship. A titre  $\geq 1.4$  was considered a positive result.

### Statistical analysis

The statistical analysis was based on a description of groups of patients by DMT and demographic variables (sex, age, MS duration, EDSS). This was followed by estimating the Odds Ratio for positive Ig bioassays based on logistic regression models (logit link function). The Wald test evaluated the presence of antibodies, vaccination status, vaccine type, multiple sclerosis disease duration, EDSS, DMTs, and COVID status. Tukey's multiple comparison test was conducted to account for all paired comparisons. Graphical representations supported these statistical models, mainly forest plots comparing the least mean square estimations of the odds ratio and the 95% confidence interval. The whole analysis was realised with R software (V4.1.0, R Core Team 2021).

## Results

### Visit 1

On visit 1, 186 PwMS were enrolled in the study, of whom 66.67% (n = 124) were women. The mean age of the PwMS was 42 years ( $\pm 12.1$ ). The mean disease duration was 9 years ( $\pm 5.78$ ). The most commonly used DMT was dimethyl fumarate (42.47%; n = 79), followed by interferon-beta (26.34%; n = 49),

and then glatiramer acetate (19.89%; n = 37). Detailed data on the characteristics of the study group during visit 1 are set out in Table 1.

During visit 1, 6.98% (n = 13) of the PwMS had positive antibodies to the S protein: 3.22% (n = 6) IgG-S and 3.76% (n = 7) IgA-S. No IgG-N was detected in any of the tested samples. At the time of visit 1, no patient had a history of positive antigen or PCR test for SARS-CoV-2. In addition, on visit 1, vaccinations against COVID-19 were not yet available. Detailed data on the analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies are set out in Table 2.

### Visit 2

On visit 2, 88 PwMS participated, of whom 60.22% were women (n = 53). The mean age of PwMS was 41 years ( $\pm 11.5$ ), and the mean disease duration was 8.0 years ( $\pm 6.59$ ). The most commonly used DMT was interferon-beta (38.63%; n = 34), followed by dimethyl fumarate (32.95%; n = 29), and then glatiramer acetate (20.45%; n = 18). Patients attending visit 2 did not significantly differ in sex, age, disease duration, or EDSS from those on visit 1. At visit 2, 20.45% (n = 18) of the PwMS had a history of a positive SARS-CoV-2 antigen or PCR result [hereinafter referred to as COVID-19 (+)]. One person obtained questionable results. The mean time from COVID-19 onset to antibodies determination was 151 days (SD  $\pm 66.75$ ). On visit 2, 42.04% (n = 37) of the PwMS had already

**Table 2.** Analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies

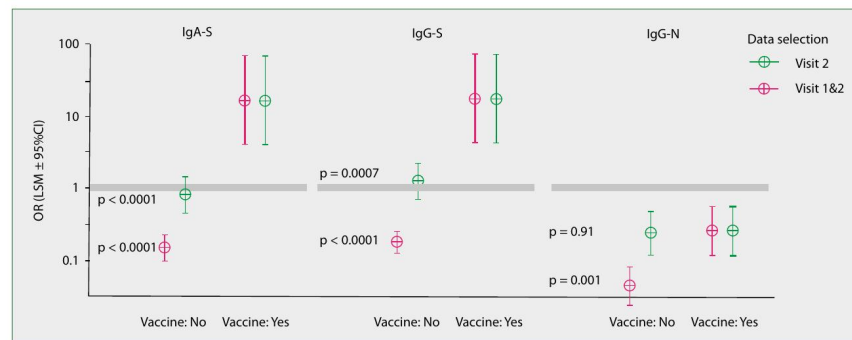
Antibody type	IgA-S	IgG-N	IgG-S
<b>Group visit 1</b>			
Percentage of positive results	3.8% (n = 7)	0.0% (n = 0)	3.2% (n = 6)
<b>Sex</b>			
Female	4.8% (n = 6)	0.0% (n = 0)	3.2% (n = 4)
Male	1.6% (n = 1)	0.0% (n = 0)	3.2% (n = 2)
<b>DMT</b>			
DMF	1.3% (n = 1)	0.0% (n = 0)	2.5% (n = 2)
INF	4.1% (n = 2)	0.0% (n = 0)	4.1% (n = 2)
GA	5.4% (n = 2)	0.0% (n = 0)	2.7% (n = 1)
Other*	9.5% (n = 2)	0.0% (n = 0)	4.8% (n = 1)
<b>History of COVID-19/Vaccine status</b>			
COVID (+)	0.00% (n = 0)		
Vaccine (+)	0.00% (n = 0)		
<b>Group visit 2</b>			
Percentage of positive results	64.7% (n = 55)	18.4% (n = 16)	71.3% (n = 62)
<b>Sex</b>			
Female	69.2% (n = 36)	15.1% (n = 8)	73.6% (n = 39)
Male	57.6% (n = 19)	23.5% (n = 8)	67.6% (n = 23)
<b>DMT</b>			
DMF	62.1% (n = 18)	6.9% (n = 2)	72.4% (n = 21)
INF	63.6% (n = 21)	27.3% (n = 9)	64.7% (n = 22)
GA	68.8% (n = 11)	16.7% (n = 3)	82.4% (n = 14)
Other**	71.4% (n = 5)	28.6% (n = 2)	71.4% (n = 5)
<b>History of COVID-19/Vaccine status</b>			
COVID-19 (-)	61.2% (n = 41)	14.5% (n = 10)	66.7% (n = 46)
COVID-19 (+)	77.8% (n = 14)	33.3% (n = 6)	88.9% (n = 16)
Vaccine (-)	42.9% (n = 21)	18.0% (n = 9)	54.0% (n = 27)
Vaccine (+)	94.4% (n = 34)	18.9% (n = 7)	94.6% (n = 35)
<b>Group visit 1 + 2</b>			
Percentage of positive results	72.1% (n = 49)	17.6% (n = 12)	76.5% (n = 52)
<b>Sex</b>			
Female	78.0% (n = 32)	14.6% (n = 6)	78.0% (n = 32)
Male	63.0% (n = 17)	22.2% (n = 6)	74.1% (n = 20)
<b>DMT</b>			
DMF	69.6% (n = 16)	4.3% (n = 1)	78.3% (n = 18)
INF	73.1% (n = 19)	30.8% (n = 8)	76.9% (n = 20)
GA	66.7% (n = 10)	13.3% (n = 2)	73.3% (n = 11)
Other***	100.0% (n = 4)	25.0% (n = 1)	75.0% (n = 3)
<b>History COVID-19/Vaccine status on visit 2</b>			
COVID-19 (-)	64.81% (n = 35)	22.22% (n = 12)	70.37% (n = 38)
COVID-19 (+)	92.31% (n = 12)	38.46% (n = 5)	92.31% (n = 12)
Vaccine (-)	46.88% (n = 15)	18.75% (n = 6)	53.13% (n = 17)
Vaccine (+)	91.43% (n = 32)	17.14% (n = 6)	94.29% (n = 33)

Group visit 1 — patients participated in first visit; group visit 2 — patients participated in second visit; group visit 1 + 2 — patients participated in both first and second visits; IgG-S — IgG antibodies against S protein; IgA-S — antibodies against S protein; IgG-N — IgG antibodies against N protein; Ig — immunoglobulin; DMT — disease-modifying therapy; DMF — dimethyl fumarate; INF — interferon; GA — glatiramer acetate; history of COVID-19 — positive antigen or PCR test in past; COVID-19 (-) — no positive antigen/PCR test in past; COVID-19 (+) — positive history of COVID-19; vaccine (-) — patients who were not vaccinated against COVID-19; vaccine (+) — patients who were full-course vaccinated against COVID-19  
 \*other: teriflunomide (n = 1); fingolimod (n = 5); cladribine (n = 3); natalizumab (n = 2)  
 \*\*other: teriflunomide (n = 5); fingolimod (n = 1); cladribine (n = 1)  
 \*\*\*other: teriflunomide (n = 4)

**Table 3.** Analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies in subgroups of patients on visit 2

Subgroup	IgA-S	IgG-N	IgG-S
COVID-19 (-) and vaccine (-) n = 46	41.5% (n = 17)	19.0% (n = 8)	50.0% (n = 21)
COVID-19 (-) and vaccine (+) n = 51	92.3% (n = 24)	7.4% (n = 2)	92.6% (n = 25)
COVID-19 (+) and vaccine (-) n = 11	50.0% (n = 4)	12.5% (n = 1)	75.0% (n = 6)
COVID-19 (+) and vaccine (+) n = 25	100.0% (n = 10)	50.0% (n = 5)	100.0% (n = 10)

IgG-S — IgG antibodies against S protein; IgA-S — antibodies against S protein; IgG-N — IgG antibodies against N protein; COVID-19 (-) — no positive antigen/PCR test in past; COVID-19 (+) — positive antigen /PCR test in past; vaccine (-) — patients who were not vaccinated against COVID-19 with any dose; vaccine (+) — patients who were full-course vaccinated against COVID-19



**Figure 1.** Odds Ratio of positive anti-SARS-CoV-2 antibodies test by vaccine status at visit 2 and at visit 1 and 2

been vaccinated with the full anti-SARS-CoV-2 vaccine course. The PwMS were mostly vaccinated with the Pfizer-BioNTech (COMIRNATY) vaccine (72.97%; n = 27). The mean time from the first dose (after Pfizer, AstraZeneca, Moderna and Johnson & Johnson vaccines) was 56.59 days (SD ± 39.79) and from the second dose (after Pfizer, AstraZeneca, and Moderna vaccines) was 28 days (SD ± 27.84). Detailed data on the characteristics of the study group during visit 2 is set out in Table 1. On visit 2, IgG-S were the most common in PwMS (71.3%, n = 62). IgA-S were present in 64.7% (n = 55), and PwMS and IgG-N in 18.4% (n = 16). The distribution of antibodies did not differ between males and females and between patients treated with individual DMTs. Detailed data on the analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies is set out in Table 2.

On visit 2, PwMS were divided into four subgroups: 1) COVID-19 (-) and not vaccinated with any dose of vaccine; 2) COVID-19 (-) and vaccinated with the full course of vaccination; 3) COVID-19 (+) and not vaccinated with any dose of vaccine; and 4) COVID-19 (+) and vaccinated with a full course of vaccination. Detailed data on the presence of antibodies in subgroups on visit 2 is set out in Table 3.

The vaccine increased the chance of detection of IgG-S and IgA-S, while no statistical difference was indicated for the detection of IgG-N (IgA-S, p < 0.0001; IgG-S, p < 0.0001; IgG-N p = 0.91) (Fig. 1). Moreover, no effect of the individual vaccine type on the presence of antibodies was demonstrated. In addition, no variation in vaccine effect in relation to the used DMT was detected (IgA-S, p = 0.28; IgG-S, p = 0.26; IgG-N, p = 0.99).

In the logistic regression model, no statistical difference between the results of any immunoglobulin tests could be identified between the COVID-19 (+) and COVID-19 (-) groups. There was no DMT effect on antibody production against SARS-CoV-2. There was no association between EDSS and antibody results (IgA-S, p = 0.80; IgG-S, p = 0.50; IgG-N, p = 0.41). The history of COVID-19 was not associated with any of the used DMTs. No effect of the MS duration on the synthesis of antibodies against SARS-CoV-2 was demonstrated.

#### Both visits

Sixty-eight patients participated in both visits, of whom 60.29% (n = 41) were women. The mean age of the patients was 42 years (± 11.5). The mean disease duration was 8.1 years

**Table 4.** Analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies in subgroups (patients attended both visits 1 and 2)

Level	IgA-S	IgG-N	IgG-S
COVID-19 (-) and vaccine (-) n = 31	42.9% (n = 12)	17.9% (n = 5)	50.0% (n = 14)
COVID-19 (-) and vaccine (+) n = 49	92.0% (n = 23)	7.7% (n = 2)	92.3% (n = 24)
COVID-19 (+) and vaccine (-) n = 7	75.0% (n = 3)	25.0% (n = 1)	75.0% (n = 3)
COVID-19 (+) and vaccine (+) n = 22	100.0% (n = 9)	44.4% (n = 4)	100.0% (n = 9)

IgG-S — IgG antibodies against S protein; IgA-S — antibodies against S protein; IgG-N — IgG antibodies against N protein; COVID-19 (-) — no positive antigen/PCR test in past; COVID-19 (+) — positive history of COVID-19; vaccine (-) — patients who were not vaccinated against COVID-19 with any dose of vaccine; vaccine (+) — patients who were vaccinated with full course against COVID-19

( $\pm$  6.59). In this group of patients, the most common DMT was INF (38.23%; n = 26), then DMF (33.82%; n = 23), and then GA (22.06%; n = 15). Detailed data on the characteristics of the study group that participated in both visits 1 and 2 is set out in Table 1.

On visits 1 and 2, 2.9% (n = 2) and 76.47% (n = 52) PwMS were IgG-S positive, respectively. On visit 1, 2.9% (n = 2) PwMS were IgA-S positive, compared to 72.06% (n = 49) on visit 2. On visit 1, none of the PwMS detected IgG-N; on visit 2, these antibodies were present in 17.65% (n = 12). Detailed data on the analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies is set out in Table 2.

The PwMS who participated in both visits were divided into four subgroups: 1) COVID (-) and not vaccinated with any dose of vaccine; 2) COVID (-) and vaccinated with a full course of vaccine; 3) COVID (+) and not vaccinated with any dose of vaccine; and 4) COVID (+) and vaccinated with a full course of vaccine. In the COVID (+) and vaccinated PwMS (n = 9), 100% were positive for both IgG-S and IgA-S. When analysing the entire group of vaccinated PwMS (n = 35), regardless of the earlier SARS-CoV-2 infection history, the presence of IgG-S was demonstrated in 94.3% (n = 33), and IgA-S in 94.1% (n = 32). Detailed data on the analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies in subgroups is set out in Table 4.

## Discussion

This study presents the serological status of PwMS treated with DMTs in a single MS centre in north-eastern Poland. Antibodies were assessed for two SARS-COV-2 proteins (S and N) in two immune classes (IgA and IgG). The study group included PwMS vaccinated with a full course against COVID-19 and unvaccinated, with and without a history of SARS-CoV-2 infection. The age of the study group, the percentage of each sex, and the average duration of the disease corresponded with the entire population of PwMS in Poland [11]. Although it is known that PwMS are at higher risk of death from some infections including respiratory failure, recent reports have shown that PwMS do not suffer from COVID-19 more severely

than the general population, and there is no significantly higher mortality in this group of patients [13, 15, 16].

However, the serological response to SARS-CoV-2 infection and vaccination is still being investigated [17]. Serological tests determine who has been exposed to the virus and are an essential tool for assessing vaccine immunity. In our study, PwMS were examined for the ability to produce antibodies against SARS-CoV-2, both after infection and vaccination. For this reason, our study determined antibodies against the N and S proteins. Available vaccines against SARS-CoV-2 induce the production of antibodies against the spike (S) protein only [18]. After infection, antibodies to various coronavirus proteins may be synthesised, e.g. against S and N protein [19]. The clinically most important difference between these antibodies is that only antibodies to the S protein have neutralising properties, which means they have protective properties against subsequent infection [5].

During visit 1, approximately 3–4 months after the beginning of the pandemic, only a few patients had antibodies against the S protein; no antibodies against the N protein were detected in any of the participants. This proves the low prevalence of SARS-CoV-2 infection among PwMS at that time. This was probably due to the extensive restrictions in Poland and the self-isolation of PwMS in the first months of the pandemic. No epidemiological studies conducted in Poland in 2020 have been published. Therefore, the data from visit 1 cannot be compared. The OBSER-CO seroepidemiological study conducted in Poland in May–June 2021 calculated the prevalence of SARS-CoV-2 in the 20–59 year-old age group (Podlaskie Voivodeship, Poland) to be 46.8–52.5% [20]. Our research shows that PwMS had lower exposure to the SARS-CoV-2 virus compared to the general population of a similar age. Similar conclusions were observed by Morales et al. in Spain, who assessed the incidence of COVID-19 in the local MS population as being lower than that in the Spanish general population [21].

This is probably, as mentioned earlier, due to the high fear of COVID-19 and the self-isolation of PwMS, especially among those treated with DMT. Neurologists treated PwMS from the first months of the pandemic, appealed for epidemiological

vigilance, and called for an improved sanitary regime due to the suspected more severe course of the disease. The data from visit 2 clearly showed the dynamics of the pandemic development, including the introduction of vaccination against COVID-19. The most common antibodies detected during visit 2 were IgG-S (71.6%), then IgA-S (65.1%), and the least common among PwMS were IgG-N (18.2%). In one study of 546 (74.2% taking DMT) PwMS, 11.7% (n = 64) of them had antibodies to SARS-CoV-2 [22]. Unfortunately, this study did not mention either the class of antibodies or the protein against which these antibodies were directed.

In another multicentre study by Sormani et al., conducted on 423 PwMS in Italy, Turkey, and Brazil, who were taking DMTs, the prevalence of IgG antibodies against SARS-CoV-2 was 76.8% [23]. Another study (n = 28) in PwMS with confirmed COVID-19 reported IgG seroprevalence in 83.3% (n = 20) of patients [23].

The results of the abovementioned studies seem to be in line with our observations. In our cohort, the mean time from COVID-19 positive antigen/PCR result to antibodies determination was 151 days (SD ± 66.75), and the mean time from the first dose of vaccine was 56.59 days (SD ± 39.79) and from the second dose was 28 days (SD ± 27.84). Recent data from a general Norwegian population shows that neutralising antibodies produced after the disease are maintained in 95% 10–12 months after COVID-19 onset [24]. Antibodies to S protein, produced after vaccination, are also detected one year after immunisation [25]. Therefore, in the study group, the time from vaccination and infection to sample collection was selected so that humoral immunity had time to develop and not disappear. Our work presents an analysis of antibodies in the IgG and IgA class and against individual SARS-CoV-2 proteins (S and N). It should be noted that no commercial IgA-N tests were available at the time of our study.

It is worth emphasising that most patients in the study group were treated with DMF, GA, or INF, and that DMT is most used in Poland. It has been demonstrated that PwMS treated with DMTs (particularly DMF, GA, INF) are immunocompetent in producing antibodies to SARS-CoV-2. It has also been demonstrated that vaccination against SARS-CoV-2 significantly induces the production of antibodies to the S protein ( $p < 0.0001$ ), which has neutralising properties. Recent studies and meta analyses have confirmed the efficacy of COVID-19 vaccines among PwMS treated with DMF, INF, and GA [26]. The presented study showed that more vaccinated PwMS with no history of COVID-19 (92.6%; n = 25) produce neutralising antibodies than do those who suffered from COVID-19 but were not vaccinated (75.0%; n = 6). This indicates that vaccination is more effective than infection in generating immunity against SARS-CoV-2.

Moreover, in the group of PwMS who were infected with COVID-19 and vaccinated, the presence of neutralising antibodies was 100%. On visit 2, among both unvaccinated

patients and those who had no history of COVID-19, neutralising antibodies were found in 50% (n = 21), which shows that there is a group of PwMS who have contracted SARS-CoV-2 asymptotically, producing immune antibodies. The presented study did not show any relationship between the ability to produce antibodies against the S protein concerning any of the tested DMTs.

This study has some limitations. Notably, the proportion of PwMS treated with individual DMTs was uneven. Most patients were treated with DMF, INF, or GA. The results of the study refer only to these medications. It should be noted that the study did not include PwMS treated with ocrelizumab or another anti-CD-20 DMT. A study conducted on 473 PwMS has shown that anti-CD-20 treatment generates a lower antibody response after COVID-19 and after vaccination ( $p > 0.001$ ) [27]. Other studies and reviews conducted so far confirm these conclusions [28, 29]. Soromani et al., in a study conducted on 780 PwMS, indicated that patients treated with fingolimod did not produce neutralising antibodies effectively after vaccination, possibly related to the leukopenia present with fingolimod treatment [26, 30]. Although our study group included patients treated with fingolimod, cladribine, and natalizumab, these groups of patients were too small for a reliable statistical analysis. In the presented study, it was impossible to demonstrate the vaccine's effect on the production of antibodies, as a majority of the participants were vaccinated with the Pfizer vaccine.

As expected, the analysis of responses against the N protein was inconsistent. Statistical analyses showed that IgG-N is not associated with infection of COVID-19. A study carried out among 683 healthcare workers at one hospital in Tokyo showed that IgG-N antibodies are the most reliable test for assessing past SARS-CoV-2 infections, including asymptomatic infections [31]. Our research does not confirm that conclusion, but the different study groups are worth noting. It seems that assessment of past infection on the basis of the N protein test is ineffective in the group of PwMS treated with DMT. The relationship between IgG-N and time from COVID-19 was also analysed, which confirmed statistical insignificance. So far, no other studies have been published analysing the anti-N protein response in PwMS. Investigating this problem in a larger group of patients with multiple sclerosis should be considered in the future. To sum up, it is worth emphasising that analyses were carried out on a population not-examined (so far) in terms of humoral response to SARS-CoV-2. Multiple sclerosis patients are a diverse population that, in addition to genetic factors, are also influenced by environmental factors. The research we present is novel because analysis of antibodies against the SARS-CoV-2 protein has not previously been carried out in north-eastern Poland. Moreover, the current literature does not provide data on the presence of antibodies against N and S proteins in other multiple sclerosis populations.

### Clinical implications/future research

We have here demonstrated that vaccination against SARS-CoV-2 significantly induces the production of antibodies against the S protein, while no difference between vaccinated and unvaccinated patients was shown in the detection of the N protein. The PwMS population requires further research in terms of serology after SARS-CoV-2 infection. Moreover, the present study did not show any relationship between the ability to produce antibodies against the S protein concerning any of the used DMTs (particularly DMF, GA, and INF). Our research showed that PwMS treated with a DMT used in the study group, especially DMF, GA and INF, are immunocompetent in producing antibodies against the SARS-CoV-2 virus, and that the prevalence of SARS-CoV-2 is lower than in the general population.

**Conflicts of interest:** None.

**Funding:** None.

### References

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497–506, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5, indexed in Pubmed: 31986264.
- Diagnosis and treatment plan of coronavirus disease 2019 (tentative sixth edition). *Glob Health J*. 2020; 4(1): 1–5, doi: 10.1016/j.glohj.2020.03.001, indexed in Pubmed: 32292830.
- Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol*. 2020; 85: 104502, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502, indexed in Pubmed: 32798769.
- Wei J, Pouwels KB, Stoesser N, et al. COVID-19 infection survey team. Anti-spike antibody response to natural SARS-CoV-2 infection in the general population. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 6250–1082, doi: 10.1038/s41467-021-26479-2, indexed in Pubmed: 34716320.
- McAndrews KM, Dowlatshahi DP, Dai J, et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight*. 2020; 5(18), doi: 10.1172/jci.insight.142386, indexed in Pubmed: 32796155.
- Kulikowska J, Kulczyńska-Przybyk A, Mroczo B, et al. The significance of COVID-19 immunological status in severe neurological complications and multiple sclerosis—a literature review. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(11), doi: 10.3390/ijms22115894, indexed in Pubmed: 34072715.
- Nicol T, Lefevre C, Serri O, et al. 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, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104511, indexed in Pubmed: 32593133.
- Jailkanen P, Pasternack A, Maljanen S, et al. A combination of N and S antigens with IgA and IgG measurement strengthens the accuracy of SARS-CoV-2 serodiagnostics. *J Infect Dis*. 2021; 224(2): 218–228, doi: 10.1093/infdis/jiab222, indexed in Pubmed: 33905505.
- Willis MD, Robertson NP. Multiple sclerosis and the risk of infection: considerations in the threat of the novel coronavirus, COVID-19/SARS-CoV-2. *J Neurol*. 2020; 267(5): 1567–1569, doi: 10.1007/s00415-020-09822-3, indexed in Pubmed: 32303837.
- Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple sclerosis: mechanisms of disease and strategies for myelin and axonal repair. *Neurol Clin*. 2018; 36(1): 1–11, doi: 10.1016/j.ncl.2017.08.002, indexed in Pubmed: 29157392.
- Kapica-Topczewska K, Collin F, Tarasiuk J, et al. Clinical and epidemiological characteristics of multiple sclerosis patients receiving disease-modifying treatment in Poland. *Neurol Neurochir Pol*. 2020; 54(2): 161–168, doi: 10.5603/PJNNS.a2020.0020, indexed in Pubmed: 32219813.
- Kapica-Topczewska K, Tarasiuk J, Choraży M, et al. The epidemiology of comorbidities among multiple sclerosis patients in northeastern Poland. *Mult Scler Relat Disord*. 2020; 41: 102051, doi: 10.1016/j.msard.2020.102051, indexed in Pubmed: 32197130.
- Czarnowska A, Broła W, Zajkowska O, et al. Clinical course and outcome of SARS-CoV-2 infection in multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies - the Polish experience. *Neurol Neurochir Pol*. 2021; 55(2): 212–222, doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0031, indexed in Pubmed: 33856686.
- Czarnowska A, Kapica-Topczewska K, Zajkowska O, et al. Symptoms after COVID-19 infection in individuals with multiple sclerosis in Poland. *J Clin Med*. 2021; 10(22), doi: 10.3390/jcm10222525, indexed in Pubmed: 34830507.
- Burkill S, Montgomery S, Hajiebrahimi M, et al. Mortality trends for multiple sclerosis patients in Sweden from 1968 to 2012. *Neurology*. 2017; 89(6): 555–562, doi: 10.1212/WNL.0000000000004216, indexed in Pubmed: 28687718.
- Capasso N, Palladino R, Montella E, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in multiple sclerosis: the hidden part of the iceberg. *J Clin Med*. 2020; 9(12), doi: 10.3390/jcm9124066, indexed in Pubmed: 33339402.
- Łoś K, Kulikowska J, Waszkiewicz N. The Impact of the COVID-19 virus pandemic on the incidence of first psychotic spectrum disorders. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(7), doi: 10.3390/ijerph19073781, indexed in Pubmed: 35409462.
- Łoś K, Kulikowska J, Waszkiewicz N. First-time psychotic symptoms in a patient After COVID-19 infection—a case report. *Front Psychiatry*. 2021; 12: 726059, doi: 10.3389/fpsy.2021.726059, indexed in Pubmed: 34721104.
- Flinck H, Rauho A, Luukinen B, et al. Comparison of 2 fully automated tests detecting antibodies against nucleocapsid N and spike S1/S2 proteins in COVID-19. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021; 99(1): 115197, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115197, indexed in Pubmed: 32977117.
- Covid-BS. OBSER-CO – raport z I tury badania. 2021.
- Piñar Morales R, Ramírez Rivas MA, Barrero Hernández FJ, et al. SARS-CoV-2 infection and seroprevalence in patients with multiple sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)*. 2021 [Epub ahead of print]; 36(9): 698–703, doi: 10.1016/j.nrl.2021.03.005, indexed in Pubmed: 33812762.
- van Kempen ZLE, Strijbis EMM, Al MM, et al. SARS-CoV-2 Antibodies in adult patients with multiple sclerosis in the Amsterdam MS cohort. *JAMA Neurol*. 2021; 78(7): 880–882, doi: 10.1001/jamaneurol.2021.1364, indexed in Pubmed: 33929488.
- Sormani MP, Schiavetti I, Landi D, et al. MuSC-19 Study Group. SARS-CoV-2 serology after COVID-19 in multiple sclerosis: An international cohort study. *Mult Scler*. 2022; 28(7): 1034–1040, doi: 10.1177/13524585211035318, indexed in Pubmed: 34328824.

24. Sarjomaa M, Diep LMy, Zhang C, et al. SARS-CoV-2 antibody persistence after five and twelve months: A cohort study from South-Eastern Norway. *PLoS One*. 2022; 17(8): e0264667, doi: [10.1371/journal.pone.0264667](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264667), indexed in Pubmed: 35947589.
25. Castro Dopico X, Ols S, Loré K, et al. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J Intern Med*. 2022; 291(1): 32-50, doi: [10.1111/joim.13372](https://doi.org/10.1111/joim.13372), indexed in Pubmed: 34352148.
26. Drulovic J, Ivanovic J, Martinovic V, et al. Humoral response to SARS-CoV-2 COVID-19 vaccines in patients with multiple sclerosis treated with immune reconstitution therapies. *Mult Scler Relat Disord*. 2021; 54: 103150, doi: [10.1016/j.msard.2021.103150](https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103150), indexed in Pubmed: 34298478.
27. Ciotti JR, Valtcheva MV, Cross AH. Effects of MS disease-modifying therapies on responses to vaccinations: A review. *Mult Scler Relat Disord*. 2020; 45: 102439, doi: [10.1016/j.msard.2020.102439](https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102439), indexed in Pubmed: 32769063.
28. Chilimuri S, Mantri N, Gongati S, et al. COVID-19 vaccine failure in a patient with multiple sclerosis on ocrelizumab. *vaccines (Basel)*. 2021; 9(3), doi: [10.3390/vaccines9030219](https://doi.org/10.3390/vaccines9030219), indexed in Pubmed: 33806646.
29. Tallantyre EC, Scurr MJ, Vickaryous N, et al. COVID-19 Vaccine Response in People with Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2022; 91(1): 89-100, doi: [10.1002/ana.26251](https://doi.org/10.1002/ana.26251), indexed in Pubmed: 34687063.
30. Sormani MP, Inglese M, Schiavetti I, et al. CovaXIMS study group on behalf of the Italian Covid-19 Alliance in MS. Effect of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in MS patients treated with disease modifying therapies. *EBioMedicine*. 2021; 72: 103581, doi: [10.1016/j.ebiom.2021.103581](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103581), indexed in Pubmed: 34563483.
31. Nishimura M, Sugawa S, Ota S, et al. Detection of silent infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by serological tests. *PLoS One*. 2022; 17(5): e0267566, doi: [10.1371/journal.pone.0267566](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267566), indexed in Pubmed: 35594509.



## 13. Publikacja 3.



Article

# Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies

Joanna Kulikowska <sup>1,\*</sup>, Katarzyna Kapica-Topczewska <sup>1</sup>, Monika Gudowska-Sawczuk <sup>2</sup>, Agnieszka Kulczyńska-Przybik <sup>2</sup>, Marcin Bazylewicz <sup>1</sup>, Anna Mironczuk <sup>1</sup>, Agata Czarnowska <sup>1</sup>, Waldemar Broła <sup>3</sup>, Barbara Mroczko <sup>2</sup>, Jan Kochanowicz <sup>1</sup> and Alina Kułakowska <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Neurology, Medical University of Białystok, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok, Poland; katarzyna-kapica@wp.pl (K.K.-T.); grandholy@gmail.com (M.B.); anna-mironczuk@wp.pl (A.M.); agata.czarnowska@umb.edu.pl (A.C.); jan.kochanowicz@uskwb.pl (J.K.); alakul@umb.edu.pl (A.K.)
  - <sup>2</sup> Department of Neurodegeneration Diagnostics, Medical University of Białystok, ul. Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok, Poland; monika.gudowska-sawczuk@umb.edu.pl (M.G.-S.); anieszka.kulczynska-przybik@umb.edu.pl (A.K.-P.); mroczko@umb.edu.pl (B.M.)
  - <sup>3</sup> Collegium Medicum, Jan Kochanowski University, Al. IX WiekówKielce 19, 25-317 Kielce, Poland; wbrola@wp.pl
- \* Correspondence: joannaikulikowska@gmail.com



**Citation:** Kulikowska, J.; Kapica-Topczewska, K.; Gudowska-Sawczuk, M.; Kulczyńska-Przybik, A.; Bazylewicz, M.; Mironczuk, A.; Czarnowska, A.; Broła, W.; Mroczko, B.; Kochanowicz, J.; et al. Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies. *Vaccines* **2024**, *12*, 255. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030255>

Academic Editors: Rishi Jaiswal, Srijani Basu, Suman Gupta and Sneha Lata Gupta

Received: 19 January 2024  
Revised: 15 February 2024  
Accepted: 19 February 2024  
Published: 29 February 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The coronavirus 2019 disease (COVID-19) course and serological statuses of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS), treated with disease-modifying therapies (DMTs) are generally parallel that of the general population. Over the pandemic’s course, however, a notable increase in the number of RRMS patients who received vaccination against severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and those who had COVID-19 (symptomatic and asymptomatic) was reported. This virus and/or vaccination likely influenced DMT-treated RRMS patients’ serological statuses regarding the presence of SARS-CoV-2 antibodies and their quantitative expression. This investigation assesses the presence and levels of the antibody directed against the S1 protein receptor binding domain (SRBD) and against the N protein of SARS-CoV-2 in 38 DMT-treated RRMS patients. The findings indicate that people vaccinated against SARS-CoV-2 exhibited significantly higher levels of IgG antibodies against S1-RBD at both assessment points. Patients with a prior history of COVID-19 demonstrated statistically significant increases in anti-N antibodies at visit 1, whereas such statistical significance was not observed at visit 2. DMT-treated RRMS patients generated neutralizing antibodies following vaccination and/or COVID-19 infection. Nevertheless, it is noteworthy that antibody levels more accurately reflect the serological status and exhibit a stronger correlation with vaccination than just the presence of antibodies.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV-2; receptor binding domain; spike protein; nucleocapsid protein; multiple sclerosis; disease-modifying therapies; antibodies; vaccines; serology

## 1. Introduction

Coronavirus 2019 (COVID-19) is a disease caused by the severe respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus, which is responsible for the pandemic that started in 2019 [1]. The genetic material of the virus comprises a single-stranded RNA that encodes 16 non-structural proteins and four structural proteins: spike (S), nucleocapsid (N), envelope (E), and membrane (M) [2]. In a clinical context, the pivotal protein is the S protein, which was found to be accountable for facilitating virus entrance into the host cell via binding to the ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) receptor [3]. The spike protein

was selected as a therapeutic target in the design of vaccines against the SARS-CoV-2 virus [4]. In addition, the antibodies against the S protein, which are produced as a result of active immunization (natural infection) and passive immunization (vaccination), are the only ones that have a neutralizing capability, thereby conferring protection against infection or reinfection [5]. It is also known that antibodies directed against the receptor binding domain (RBD) within the S1 subunit (anti-S1RBD antibodies) have the highest neutralizing capacity [6]. Moreover, the S1-RBD subunit exhibits minimal amino acid sequence homology compared to other coronaviruses [4]. The second clinically significant protein of the SARS-CoV-2 virus is the nucleocapsid (N) protein, which is responsible for the replication and transcription of viral RNA [7]. The N protein, as with the S protein, induces a humoral response. However, antibodies directed against the N protein are solely generated after natural infection but not after vaccination [8]. As in most European countries, in Poland, in December 2020, a mass vaccination program against COVID-19 began, initially available to selected risk groups (including healthcare workers). From May 2021, all adult Poles could receive the first dose of the vaccine. Registration for the second dose of the vaccine opened in November 2021. From April 2022, the second booster dose of the vaccine could be administered to people over 80 years of age, and from September 2022, all people over 12 years of age. The first available vaccine was the Comirnaty mRNA vaccine (Pfizer-BioNTech; Marburg, Germany). Subsequently, another mRNA vaccine, Spikevax (Moderna Biotech Spain, S.L, Madrid, Spain), was approved. Other vaccines approved in EU countries (including those used en masse in Poland) were vector vaccines: Vaxzevria (AstraZeneca; Cambridge, UK) and Janssen Vaccine (Janssen-Cilag International NV; Beerse, Belgium) and a protein vaccine (Nouvaxovid Novavax; Gaithersburg, MD, USA). In May 2021, the Polish Neurological Society published an official position recommending COVID-19 vaccination for patients suffering from multiple sclerosis. Patients treated with beta interferons (INF), glatiramer acetate (GA), teriflunomide (TFN), dimethyl fumarate (DMF), and natalizumab (NTZ) should consider vaccination at every stage of treatment (no change in the therapy schedule is necessary). The guidelines specify groups of patients treated with fingolimod, ocrelizumab, cladribine, and alemtuzumab, where vaccination schemes are proposed depending on the time of DMT administration [9]. In subsequent stages of the pandemic, the Polish Neurological Society updated its position on additional doses and booster doses [10].

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating autoimmune disease that impacts individuals across various age groups. The disease is predominantly diagnosed during the third decade of life [11]. MS is treated with immunomodulating and immunosuppressive drugs, termed disease-modifying therapies (DMTs). In Poland, 15 DMTs are currently available and financed by the National Health Fund. Nevertheless, the predominant cohort comprises individuals primarily undergoing treatment with dimethyl fumarate (DMF), glatiramer acetate (GA), or beta-interferon (INF) [12]. During the first months of the pandemic, physicians and patients wanted to know whether the treatment and the disease itself would negatively affect the course of SARS-CoV-2 infection [13]. In line with current knowledge, MS patients treated with most of the DMTs were infected by the SARS-CoV-2 infection at similar rates as the rest of society [14]. In addition, the response of this group of patients to vaccination against COVID-19, except for patients treated with anti-CD20 therapies and fingolimod, is normal [15]. At the time of the pandemic and afterward, the number of patients who had received subsequent vaccine doses and those who had come into contact with the SARS-CoV-2 virus increased. This increase probably affected the serological status of this specific group of patients, not only in terms of the mere presence of antibodies against S and N proteins but also the levels of these proteins, which seems to be important for future monitoring of the immunity of patients with MS who are treated with DMTs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Group

The study group consisted of patients ( $n = 38$ ) with relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) who were treated with selected DMTs: DMF (36.84%;  $n = 14$ ), GA (26.32%;  $n = 10$ ), or INF (36.84%;  $n = 14$ ). All examined patients were diagnosed in accordance with the McDonald criteria 2017 and were under the care of the Department of Neurology, Medical University of Białystok [16]. Blood samples were collected twice between December 2021 and February 2023 (median 18.33 months) from each patient. During each visit, the following data were collected: (1) patient’s age, type and duration of disease-modifying drug used, COVID-19 vaccinations received (number of doses, dates of vaccinations, types of vaccinations), and documented positive result based on the polymerase chain reaction (PCR/COVID-19 antigen test). During both visits, the patients were examined by a neurologist. All individuals signed informed consent to participate in this study.

A total of 57.89% ( $n = 22$ ) of the study group were women. The average age at the first visit was 44.5 years. The average duration of the disease was 9 years. The average duration of using DMF is 3.4 years ( $SD \pm 1.4$ –6.3), GA 5.1 years ( $SD \pm 1.3$ –9.1), INF 10 years ( $SD \pm 1.0$ –9.2). Among all vaccine doses received by patients, 75% were vaccinated with the Comirnaty vaccine (Pfizer-BioNtech; Marburg, Germany), 12.50% with the Vaxzeveria vaccines (AstraZeneca; Cambridge, Great Britain, 6.94% with the Spikevax (Moderna Biotech Spain, S.L., Madrid, Spain) and 5.56% with the Janssen Vaccine (Janssen-Cilag International NV; Beerse, Belgium).

The study was approved (approval NAPK.002.230.2020) by the Bioethics Committee at the Medical University of Białystok, Poland.

The detailed clinical characteristics of the study group are shown in Tables 1 and 2.

**Table 1.** Characteristics of the study group.

Sex	Female	57.89% ( $n = 22$ )
	Male	42.11% ( $n = 16$ )
Age (on visit 1)		44,50 (36.25, 48.75) <sup>1</sup>
DMT	DMF	36.84% ( $n = 14$ )
	GA	26.32% ( $n = 10$ )
	INF	36.84% ( $n = 14$ )
Time between visit 1 and 2		18.33 (17.70, 18.84) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Median (Q1, Q3); DMT, dimethyl fumarate; GA, glatiramer acetate; INF, interferon beta.

### 2.2. Laboratory Tests

An assessment of antibodies against the SARS-CoV-2 virus was conducted: (1) IgG antibodies against the receptor binding domain of S1 protein (IgG-S1RBD) and (2) IgG antibodies against N protein (IgG-N). Serum levels of the IgG-S1RBD and IgG-N antibodies were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) according to the manufacturer’s instructions. The result in the chemiluminescent reaction was assessed as relative light units (RLU) using the automatic Alinity system (Abbott, Chicago, IL, USA) according to the manufacturer’s instructions. The level of serum antibodies was directly proportional to the RLU detected by the system optics. The S/C (serum/cut-off) index was determined based on the above relationship. A titer  $\geq 1.4$  (IgG-N) and  $\geq 50$  (IgG-SRBD) was considered a positive result.

**Table 2.** Detailed characteristics of study groups.

	Visit 1	Visit 2
Vaccinated <sup>2</sup>	60.52% (n = 23)	71.05% (n = 27)
One dose	26.09% (n = 6)	3.70% (n = 1)
Two doses	73.91% (n = 17)	40.74% (n = 11)
Three doses	0	48.15% (n = 13)
Four doses	0	7.41% (n = 2)
Time between first dose and visit [months]	1.69 (1.10; 2.48) <sup>1</sup>	27.37(26.24; 28.21) <sup>1</sup>
Time between second dose and visit [months]	1.03 (0.38; 1.53) <sup>1</sup>	18.74 (17.77; 19.66) <sup>1</sup>
Time between third dose and visit [months]	-	11.70 (10.81; 12.42) <sup>1</sup>
Time between fourth dose and visit [months]	-	11.70 (1.81; 12.42)
unvaccinated	39.47% (n = 15)	28.95% (n = 11)
COVID-19“+” <sup>3</sup>	18.42% (n = 7)	23.68% (n = 9)
COVID-19“−” <sup>4</sup>	81.58% (n = 31)	76.32%(n = 29)
Time between COVID-19 and visit [months]	4.93 (4.70; 5.95) <sup>1</sup>	23.56 (12.78; 25.00) <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Median (Q1, Q3); <sup>2</sup> Vaccinated—people with multiple sclerosis (PwMS) vaccinated against coronavirus 2019 disease (COVID-19); <sup>3</sup> COVID-19“+”—PwMS with registered positive PCR/antigen test in the past; <sup>4</sup> COVID-19“−”—PwMS with no registered positive PCR/antigen test in the past.

### 2.3. Statistical Analysis

The statistical analysis was based on a description of groups of patients classified by DMT and survey data (sex, age, COVID-19 status, vaccination status). The significance level of the statistical tests in this analysis was set at  $\alpha = 0.05$ . The normality of the distributions of the variables was analyzed using the Shapiro–Wilk test. Numerical variables with distributions deviating from the normal distribution were reported as *Mdn* (Q1, Q3). Examination of differences within a numerical variable with a non-normal distribution between two groups was performed with the Wilcoxon rank sum test and between three or more groups was performed with the Kruskal–Wallis rank sum test. The significance of differences between pairs of groups was tested using Dunn’s test. The effects of vaccination or past COVID-19 infection over time (visits 1 and 2) on the concentration of SARS-CoV-2 IgG (S-RBD, N) were examined using a linear mixed model. In the case of dichotomous response variables (SARS-CoV-2 IgG positive result for S-RBD or N), a generalized linear model was applied. The magnitude of the effect between categories within an exploratory variable with more than two categories (such as the number of vaccine doses) was estimated by contrast analysis of the estimated marginal means with the Tukey adjustment. Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was used to measure the strength and direction of association between two variables. Analyses were conducted using the R Statistical language (version 4.1.1; R Core Team, 2021) on Windows 10 x64 (build 19045).

## 3. Results

### 3.1. Analysis of Antibodies against S1 Protein

#### 3.1.1. Impact of Vaccination

At visit 1, patients with RRMS who had not been vaccinated against SARS-CoV-2 accounted for 39.47% (n = 15) and vaccinated 60.53% (n = 23). At visit 1, among unvaccinated patients with RRMS, 33.33% (n = 5) had no antibodies against S1-RBD, while 66.67% (n = 10) had positive antibodies. Among vaccinated patients with RRMS, 91.30% (n = 21) showed positive anti-S1RBD IgG antibodies. At visit 2, 28.95% (n = 11) of RRMS patients were unvaccinated, and 71.05% (n = 27) were vaccinated against SARS-CoV-2. Among the unvaccinated patients, 9.09% (n = 1) tested negative for S1RBD antibodies, while 90.91% (n = 10) tested positive. Of the vaccinated patients, 3.70% (n = 1) were S1RBD negative

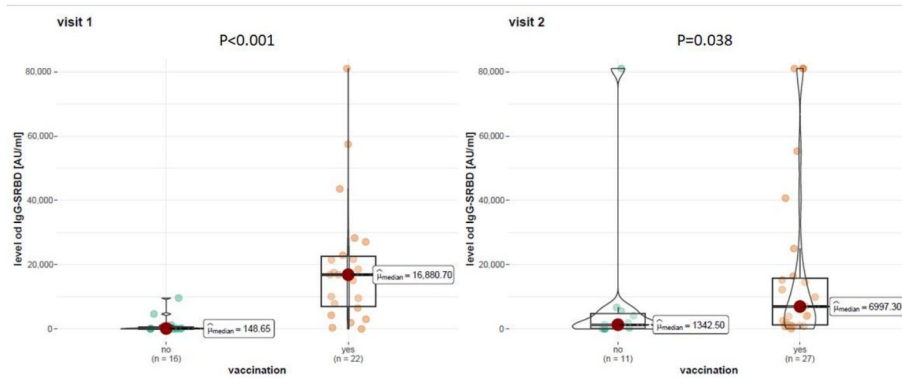
and 96.30% ( $n = 26$ ) positive. Statistical analysis showed that percentages of IgG-S1RBD results between vaccinated and unvaccinated patients with RRMS were not statistically significant (visit 1:  $p = 0.089$ ; visit 2  $p = 0.501$ ). However, at visit 1, the number of positives was higher in the vaccinated group than in the unvaccinated group, which was significant at the trend level ( $0.050 \leq p < 0.100$ ). In addition, a significant main effect of the time factor (the odds of getting a positive SARS-CoV-2 anti-S1RBD result at visit 2 was significantly higher (41.227-fold) than at visit 1. Detailed data concerning the presence of anti-S1RBD antibodies are shown in Table 3.

**Table 3.** Presence of anti-S1RBD IgG antibodies in COVID-19 vaccinated and unvaccinated patients at visits 1 and 2.

	IgG-S1RBD Results	Vaccination against SARS-CoV-2		p-Value <sup>1</sup>
		No	Yes	
Visit 1 ( $n = 38$ )	Negative	33.33% ( $n = 5$ )	8.70% ( $n = 2$ )	$p = 0.089$
	Positive	66.67% ( $n = 10$ )	91.30% ( $n = 21$ )	
Visit 2 ( $n = 38$ )	Negative	9.09% ( $n = 1$ )	3.70% ( $n = 1$ )	$p = 0.501$
	Positive	90.91% ( $n = 10$ )	96.30% ( $n = 26$ )	

<sup>1</sup> Fisher’s exact test.

At visit 1, the mean anti-S1RBD antibody level was 16,863.40 AU/mL among vaccinated patients with RRMS and 197.90 AU/mL among unvaccinated. At visit 2, the mean level of anti-S1-RBD antibodies was 6997.30 AU/mL among vaccinated patients with RRMS and 1342.50 AU/mL among unvaccinated. The statistical analysis showed that vaccination had a statistically significant effect on anti-S1-RBD antibody levels at visit 1 ( $p < 0.001$ ) and visit 2 ( $p = 0.038$ ). Detailed data on the level of anti-S1RBD antibodies are given in Figure 1.



**Figure 1.** Level of anti-S1RBD antibodies in COVID-19 vaccinated and unvaccinated patients at visit 1 and 2.

### 3.1.2. Impact of COVID-19

A positive antigen test or PCR was a COVID-19 infection indicator. At visit 1, patients with COVID-19 (+), 100% ( $n = 7$ ) were positive for anti-S1RBD antibodies. However, among patients with COVID-19 (−), 77.42% ( $n = 24$ ) were positive for anti-S1RBD antibodies. At visit 2, among COVID-19 (+) patients, 100% ( $n = 9$ ) tested positive for anti-S1RBD antibodies. However, among COVID-19 (−) patients, 93.10% ( $n = 27$ ) tested positive for anti-S1RBD

antibodies. Detailed data on the presence of anti-SRBD antibodies are shown in Table 4. The statistical analysis showed that the percentages of anti-S1RBD results between patients with COVID-19 (+) and COVID-19 (−) illness were not statistically significant (visit 1:  $p = 0.309$ ; visit 2  $p = 1.00$ ).

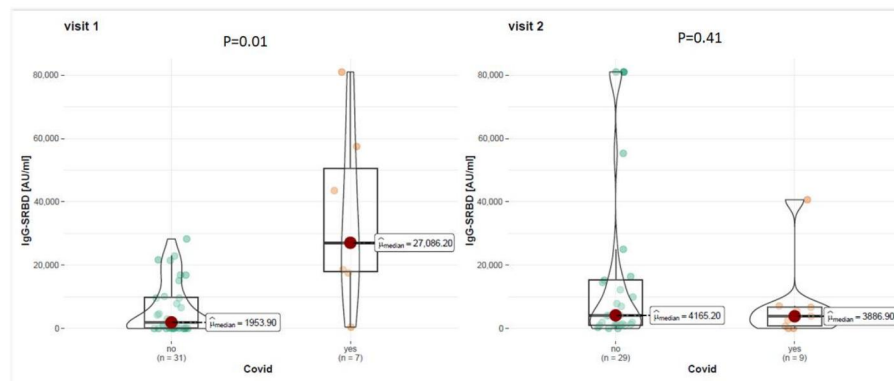
**Table 4.** Presence of anti-SRBD IgG antibodies in patients with or without a registered history of COVID-19 at visit 1 and visit 2.

	IgG-SRBD Results	History of COVID-19		p-Value <sup>1</sup>
		No	Yes	
Visit 1 <i>n</i> = 38	Positive	77.42% ( <i>n</i> = 24)	100% ( <i>n</i> = 7)	$p = 0.309$
	Negative	22.58% ( <i>n</i> = 7)	0.00%	
Visit 2 <i>n</i> = 38	Positive	93.10% ( <i>n</i> = 27)	100% ( <i>n</i> = 9)	$p = 1.00$
	Negative	6.90% ( <i>n</i> = 2)	0.00%	

<sup>1</sup> Fisher’s exact test.

History of COVID-19 registered positive polymerase chain reaction (PCR)/antigen test in the past. Among the patients with confirmed COVID-19, just one patient was hospitalized due to COVID-19, and the patient received convalescent plasma and steroids.

At visit 1, among COVID-19 (+) patients, the mean level of anti-S1RBD antibodies was 27,086.20 AU/mL, while among COVID-19 (−) patients, it was 1953.90 AU/mL. At visit 2, among COVID-19 (+) patients, the level of anti-S1RBD antibodies was 3886.90 AU/mL, while among COVID-19 (−) patients, it was 4165.20 AU/mL. Statistical analysis showed that COVID-19 survivors had statistically significantly higher levels of anti-S1RBD antibodies at visit 1 ( $p = 0.001$ ) but not at visit 2 ( $p = 0.410$ ). Detailed data on the level of anti-S1RBD antibodies are presented in Figure 2.



**Figure 2.** Level of anti-SRBD IgG antibodies in patients with or without registered history of COVID-19 at visit 1 and 2.

**3.2. Analysis of Antibodies against N Protein**

At Visit 1, 28.57% ( $n = 2$ ) of COVID-19 (+) patients were positive for anti-N antibodies. However, among COVID-19 (−) patients, 9.68% ( $n = 3$ ) were negative for anti-N antibodies.

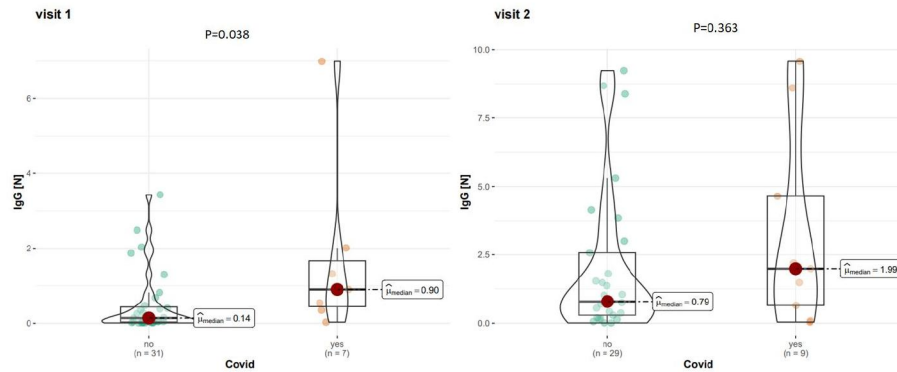
At visit 2, 66.67% ( $n = 6$ ) of COVID-19 (+) patients were positive for anti-N antibodies. Among COVID-19 (−) patients, 37.93% ( $n = 11$ ) tested positive for anti-N protein antibodies. Detailed results of anti-N protein antibodies are shown in Table 5. Statistical analysis showed that the percentages of IgG-N results between patients with COVID-19 (+) and COVID-19 (−) were not statistically significant (first visit:  $p = 0.223$ ; second visit  $p = 0.249$ ).

**Table 5.** Presence of IgG-N antibodies in patients with or without registered history of COVID-19 at visit 1 and visit 2.

	IgG-N Results	History of COVID-19		p-Value <sup>1</sup>
		No	Yes	
Visit 1 $n = 38$	Positive	9.68% ( $n = 3$ )	71.43% ( $n = 35$ )	$p = 0.223$
	Negative	90.32% ( $n = 28$ )	28.57% ( $n = 2$ )	
Visit 2 $n = 38$	Positive	37.93% ( $n = 11$ )	66.67% ( $n = 6$ )	$p = 0.249$
	Negative	62.07% ( $n = 18$ )	33.33% ( $n = 3$ )	

<sup>1</sup> Fisher’s exact test. History of COVID-19 registered positive PCR/antigen test in the past.

At visit 1, among COVID-19 (+) patients, the mean level of IgG-N was 0.90 AU/mL, while among COVID-19 (−) patients, it was 0.14 AU/mL. At visit 2, among COVID-19 (+) patients, the level of anti-N antibodies was 1.99 AU/mL, while for COVID-19 (−) patients, it was 0.79 AU/mL. Detailed data on the level of anti-N antibodies are shown in Figure 3. The statistical analysis showed that COVID-19 (+) patients had statistically significantly higher levels of anti-N antibodies at visit 1 ( $p = 0.040$ ) but not at visit 2 ( $p = 0.363$ ). A significant main effect of time was observed, indicating that anti-N levels were significantly higher than at visit 1. Levels of antibodies IgG-S1RBD and IgG-N according to particular DMTs are presented in the Supplementary Materials.



**Figure 3.** Level of IgG-N antibodies in patients with or without registered history of COVID-19 on visit 1 and 2.

**4. Discussion**

Our study shows the result of the analysis of both the presence and actual levels of antibodies directed against the receptor binding domain of the S1 protein and against

the N protein of the SARS-CoV-2 virus in patients with RRMS who were treated with DMF, GA, or INF. During the first months of the pandemic, it was unknown whether patients undergoing immunomodulatory treatment were at risk of a more severe course of the disease [17]. Current clinical experience shows that SARS-CoV-2 infection can impact on central nervous system, but patients with MS, in most cases, do not suffer more seriously from COVID-19 than the general population [14]. Risk factors for a more severe course, such as male sex, comorbidities, or severe disability, are similar to those in the non-MS group [18–20]. The subsequent months of the pandemic also showed that patients treated with selected and often used DMTs showed an adequate humoral response to vaccinations [21,22]. Moreover, the side effects of vaccinations against SARS-CoV-2 were mild, and the vaccinations themselves were safe in this group of patients [14,23]. During the first period of the pandemic, the serological status of patients was also assessed. It was shown that vaccinations significantly induced the production of neutralizing antibodies in patients treated with DMT, GA, or INF [24]. It is worth noting that it is currently known that in the group treated with anti-CD20 and sphingosine-1-phosphate modulators, the course of the disease may be more severe, and the immune response to vaccinations may be impaired [22]. Over the duration of the pandemic and after it ended, the group of patients who received subsequent doses of the vaccine, in addition to those who had COVID-19 infections, grew. For this reason, the serological status of this group of patients may change, and it seems that in addition to the presence of antibodies, their levels may also be important. Neutralizing IgG antibodies are known to increase from two to eight weeks post-infection, followed by a decline ranging from four to six months with a median time to seronegativity of approximately two years [25].

The literature shows that the most specific and the least likely to cross-react antibodies are those directed against the S1 protein receptor binding domain, so we tested these antibodies in our research [26]. At visit 1, the presence of these antibodies was found in almost 82% of the study group. Analyzing the subgroups at visit 1, we could see that in the vaccinated group, neutralizing antibodies were present in 91.30% of patients with RRMS. At visit 2, in the entire study group, neutralizing antibodies were found in 94.74% of patients, including 96.30% of vaccinated and 90.91% of unvaccinated patients. In the latter group of patients, the presence of neutralizing antibodies is probably due to passive immunization after asymptomatic contact with SARS-CoV-2. The results obtained in our study are similar to previously published studies. A meta-analysis by Gombolay et al. showed that the humoral response after vaccination occurs in 77% of patients with MS compared to 93% of the healthy population [22]. This study also analyzed individual DMTs and found that 96% of those were treated with INF, 95% of those treated with GA, and 99% of those treated with DMF [22]. However, results from the statistical analysis did not show a difference between vaccinated and unvaccinated people, which is probably due to the high prevalence of the SARS-CoV-2 virus in the population of patients with MS. In Poland, the OBSER-CO seroepidemiological study was conducted (IV series of analysis in 2021 and 2022) based on the WHO-Unity protocol: "Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 infection" [27]. Comparing the results obtained in our study to the results conducted as part of OBSER-CO in northeastern Poland on a group of patients of a similar age, we can note that during visit 1, more patients with MS were vaccinated than in the general population (61% vs. 31–58%). However, during visit 2, these proportions practically equalized (71% vs. 67%). Comparing the seroprevalence (presence of IgG-S antibodies) in the MS population to the general population in northeastern Poland during visit 1, it can be seen that the prevalence of neutralizing antibodies was much higher in the MS group (84.2% vs. 57–73%) [28]. This can be explained by the higher vaccination rate of the studied group of patients, as shown by previous data. During visit 2, within 1.5 years later, the seroprevalence was practically at the same level (94.7% vs. 93.4%). Data from OBSER-CO 2023 have not been published yet.

At visit 1, the number of neutralizing antibody positives was higher in the group vaccinated at the trend level ( $p = 0.089$ ). Many of these patients treated with DMTs had



asymptomatic contact with the virus, which induced the presence of antibodies. In the next step, levels of antibodies directed against the receptor binding domain of the S1 protein were analyzed. A statistical analysis of these data showed that vaccinated patients with RRMS had statistically significantly higher antibody levels at both visits than unvaccinated subjects. It is worth noting that in vaccinated people with multiple sclerosis (PwMS), neutralizing antibody levels were lower at visit 2 (16,863.40 AU versus 6997.30 AU at visit 1). A similar observation was made after analyzing IgG-S1RBD and IgG-N according to particular DMTs. At visit 2, the median time since the last vaccination was longer than at visit 1 (<2 months since the last vaccination at visit 1 versus approximately 12–18 months at visit 2). Due to this strong induction of antibody levels, subsequent vaccination doses against COVID-19 are still highly recommended for MS patients. Interestingly, the level of neutralizing antibodies in unvaccinated patients increased at visit 2 (1342.5 AU) compared to visit 1 (197.80 AU) but did not reach the level observed in vaccinated PwMS. However, it should be noted that, currently, the level of neutralizing antibodies that would protect against COVID-19 has not been determined. It is not known whether a higher level clearly means higher protection. Research conducted by Hickey et al. on the general population showed that the levels of antibodies in vaccinated people were significantly higher than in people after infection. Studies show that in addition to antibody levels, avidity was higher in the vaccinated group, which may even better reflect the level of protection against reinfection. For each vaccine, circulating antibody levels decreased one to four months after the second dose [29]. It is worth emphasizing at this point that the protective level of neutralizing antibodies has not yet been determined. In a multicenter study, a group of 2nd and 3rd doses administered to patients with MS similarly caused a decrease in neutralizing antibodies within six months post-vaccination but still remained high compared to unvaccinated subjects. We also analyzed IgG antibodies against the N protein, which are induced only after natural contact with the virus. No significant differences in the percentage of positive results between people with and without previous COVID-19 were found. After analyzing the levels of antibodies, a statistically significantly higher level of antibodies was shown only during the first visit (2021). This seems to be related to less frequent testing of patients for SARS-CoV-2 during the subsequent years of the pandemic (second visit in 2023) and to the greater prevalence of the virus in the population. In addition, a significant factor is also the short duration of antibodies directed against the N protein, namely, less than one year. All these factors make the interpretation of the presence and levels of anti-N protein antibodies difficult and should be closely correlated with the clinical status of the patient. Literature shows that vaccinated people who contracted COVID-19 have higher levels of antibodies compared to people who were only vaccinated or only after natural infection (hybrid immunity) [30]. An interesting observation is that during visit 2, in the subgroup of patients with confirmed COVID-19 in the past, the level of neutralizing antibodies was lower than in the group of patients without documented COVID-19 (3886.9 AU versus 4165.2 AU). In addition to high vaccination rates in the subsequent years of the pandemic, it can be assumed that a significant percentage of the population and patients with MS have already had natural contact with the virus. Our data shows that none of the participants tested positive (PCR or antigen test) for COVID-19 between visits 1 and 2. Moreover, the levels of IgG-N at visit 2 were higher than that in visit 1 in vaccinated and unvaccinated patients and according to particular DMTs. That may indicate that part of the study group probably had SARS-CoV-2 infection and did not decide to test or had asymptomatic infections. Recent studies and literature reviews also point to the importance of assessing not only antibodies but also cell-mediated immunity, which seems to last longer than humoral immunity [31].

Our research has limitations, one of which includes a small study group. The small size probably contributed to the limitations of statistical analyses and did not allow for reliable analysis of particular DMT subgroups. In conclusion, our research shows that, in addition to the presence of antibodies against the S1 protein (RBD), it is important to assess their levels. Patients with RRMS who were vaccinated against SARS-CoV-2 had

significantly higher levels of neutralizing antibodies in subsequent years of the pandemic. The assessment of anti-N antibodies is difficult due to the high seroprevalence of the virus in the population and the short half-life and should be closely correlated with the clinical picture.

## 5. Conclusions

Our research shows that SARS-CoV-2 vaccinated patients with RRMS treated with DMT, GA, or INF have statistically significantly higher levels of antibodies directed against the receptor binding domain of the S1 protein compared to unvaccinated. This was observed over the course of two years of the pandemic. Levels of neutralizing antibodies seem to better reflect the level of protection against the SARS-CoV-2 virus than their presence alone, but this requires further research. In the presented retrospective study, it was observed that patients treated with the selected DMTs (INF, GA, DMF) were immunocompetent in terms of the production of neutralizing antibodies. In conjunction with the above data and current world literature, recommendations for preventive vaccinations for MS patients are justified. Although a clearly protective level of antibodies has not been currently determined, a higher level potentially provides better protection for patients against disease and reinfection. Further randomized studies are still necessary.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines12030255/s1>, Table S1. IgG-S1RBD and IgG-N levels according to particular DMTs.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.K. (Joanna Kulikowska), B.M., A.K. and K.K.-T.; methodology, J.K. (Joanna Kulikowska), M.G.-S. and B.M.; software, A.M. and M.B.; validation, J.K. (Joanna Kulikowska), A.M., A.K., J.K. (Jan Kochanowicz) and A.C.; formal analysis, A.M., M.B. and J.K. (Joanna Kulikowska); investigation, J.K. (Joanna Kulikowska), A.K.-P. and K.K.-T.; resources, J.K. (Joanna Kulikowska), M.G.-S. and W.B.; data curation, J.K. (Joanna Kulikowska), M.G.-S. and W.B.; writing—original draft preparation, J.K. (Joanna Kulikowska), K.K.-T., A.M., M.B., M.G.-S. and A.K.-P.; writing—review and editing, A.C., A.K., W.B., J.K. (Jan Kochanowicz) and B.M.; visualization, J.K. (Joanna Kulikowska) and A.K.-P.; supervision, J.K. (Jan Kochanowicz) and A.K.; project administration, J.K. (Joanna Kulikowska) and K.K.-T.; funding acquisition, J.K. (Jan Kochanowicz). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved (approval No. APK.002.230.2020) by the Bioethics Committee at the Medical University of Białystok, Poland.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and supplementary materials.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **2020**, *395*, 565–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, D.; Lee, J.-Y.; Yang, J.-S.; Kim, J.W.; Kim, V.N.; Chang, H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **2020**, *181*, 914–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ou, X.; Liu, Y.; Lei, X.; Li, P.; Mi, D.; Ren, L.; Guo, L.; Guo, R.; Chen, T.; Hu, J.; et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Poland, G.A.; Ovsyannikova, I.G.; Kennedy, R.B. SARS-CoV-2 immunity: Review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet* **2020**, *396*, 1595–1606. [[CrossRef](#)]
- Liu, K.-T.; Han, Y.-J.; Wu, G.-H.; Huang, K.-Y.A.; Huang, P.-N. Overview of Neutralization Assays and International Standard for Detecting SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody. *Viruses* **2022**, *14*, 1560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Dutta, N.K.; Mazumdar, K.; Gordy, J.T. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: A Target for Vaccine Development. *J. Virol.* **2020**, *94*, 13. [CrossRef]
8. Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Strich, J.R.; Chertow, D.S.; Davey, R.T.; Cohen, J.I. 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. [CrossRef]
9. Polish Neurological Society; Stanowisko dot. Szczepień Przeciwko SARS-CoV-2 Dostępnymi w Polsce Szczepionkami u Pacjentów z SM. Available online: <https://ptneuro.pl/aktualnosc/stanowisko-dot-szczepien-przeciwko-sars-cov-2-dostepnymi-w-polsce-szczepionkami-u> (accessed on 18 February 2024).
10. Polish Neurological Society; Stanowisko Dotyczące 3. Dawki Szczepionki mRNA Przeciwko SARS-CoV-2 u Pacjentów z SM. Available online: <https://ptneuro.pl/aktualnosc/stanowisko-dotyczace-3-dawki-szczepionki-mrna-przeciwko-sars-cov-2-u-pacjentow-z-sm> (accessed on 18 February 2024).
11. Kapica-Topczewska, K.; Collin, F.; Tarasiuk, J.; Choraży, M.; Czarnowska, A.; Kwaśniewski, M.; Broła, W.; Bartosik-Psujek, H.; Adamczyk-Sowa, M.; Kochanowicz, J.; et al. Clinical and epidemiological characteristics of multiple sclerosis patients receiving disease-modifying treatment in Poland. *Neurol. i Neurochir. Polska* **2020**, *54*, 161–168. [CrossRef]
12. Kapica-Topczewska, K.; Tarasiuk, J.; Choraży, M.; Czarnowska, A.; Broła, W.; Szczepański, M.; Kochanowicz, J.; Kulakowska, A. The epidemiology of comorbidities among multiple sclerosis patients in northeastern Poland. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *41*, 102051. [CrossRef] [PubMed]
13. Czarnowska, A.; Zajkowska, J.; Kulakowska, A. Impact of SARS-CoV-2 on the nervous system. *Neurol. i Neurochir. Polska* **2023**, *57*, 26–35. [CrossRef]
14. Czarnowska, A.; Broła, W.; Zajkowska, O.; Rusek, S.; Adamczyk-Sowa, M.; Kubicka-Baczyk, K.; Kalinowska-Lyszczarz, A.; Kania, K.; Słowik, A.; Wnuk, M.; et al. Clinical course and outcome of SARS-CoV-2 infection in multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies—The Polish experience. *Neurol. i Neurochir. Polska* **2021**, *55*, 212–222. [CrossRef]
15. Sormani, M.P.; Schiavetti, I.; Landi, D.; Carmisciano, L.; De Rossi, N.; Cordioli, C.; Moiola, L.; Radaelli, M.; Immovilli, P.; Capobianco, M.; et al. SARS-CoV-2 serology after COVID-19 in multiple sclerosis: An international cohort study. *Mult. Scler. J.* **2021**, *28*, 1034–1040. [CrossRef]
16. Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 162–173. [CrossRef] [PubMed]
17. Lucchini, M.; Bianco, A.; Del Giacomo, P.; De Fino, C.; Nociti, V.; Mirabella, M. Is serological response to SARS-CoV-2 preserved in MS patients on ocrelizumab treatment? A case report. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *44*, 102323. [CrossRef] [PubMed]
18. Łoś, K.; Kulikowska, J.; Waszkiewicz, N. The Impact of the COVID-19 Virus Pandemic on the Incidence of First Psychotic Spectrum Disorders. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 3781. [CrossRef] [PubMed]
19. Zabalza, A.; Cárdenas-Robledo, S.; Tagliani, P.; Arrambide, G.; Otero-Romero, S.; Carbonell-Mirabent, P.; Rodríguez-Barranco, M.; Rodríguez-Acevedo, B.; Vera, J.L.R.; Resina-Salles, M.; et al. COVID-19 in multiple sclerosis patients: Susceptibility, severity risk factors and serological response. *Eur. J. Neurol.* **2020**, *28*, 3384–3395. [CrossRef] [PubMed]
20. Zhang, J.-J.; Dong, X.; Liu, G.-H.; Gao, Y.-D. Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2023**, *64*, 90–107. [CrossRef] [PubMed]
21. Capasso, N.; Palladino, R.; Montella, E.; Pennino, F.; Lanzillo, R.; Carotenuto, A.; Petracca, M.; Iodice, R.; Iovino, A.; Aruta, F.; et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Multiple Sclerosis: The Hidden Part of the Iceberg. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 4066. [CrossRef]
22. Gombolay, G.Y.; Dutt, M.; Tyor, W. Immune responses to SARS-CoV-2 vaccination in multiple sclerosis: A systematic review/meta-analysis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2022**, *9*, 1321–1331. [CrossRef] [PubMed]
23. Czarnowska, A.; Tarasiuk, J.; Zajkowska, O.; Wnuk, M.; Marona, M.; Nowak, K.; Słowik, A.; Jamroz-Wiśniewska, A.; Rejdak, K.; Lech, B.; et al. Safety of Vaccines against SARS-CoV-2 among Polish Patients with Multiple Sclerosis Treated with Disease-Modifying Therapies. *Vaccines* **2022**, *10*, 763. [CrossRef] [PubMed]
24. Kulikowska, J.; Czarnowska, A.; Gudowska-Sawczuk, M.; Kulczyńska-Przybik, A.; Bazylewicz, M.; Collins, F.; Choraży, M.; Mroczo, B.; Kochanowicz, J.; Kapica-Topczewska, K.; et al. Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies. *Neurol. i Neurochir. Polska* **2023**, *57*, 121–130. [CrossRef] [PubMed]
25. Elslande, J.V.; Oyaert, M.; Lorent, N.; Vande, Y. Lower persistence of anti-nucleocapsid compared to anti-spike antibodies up to one year after SARS-CoV-2 infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2022**, *103*, 115659. [CrossRef] [PubMed]
26. Gudowska-Sawczuk, M.; Moniuszko-Malinowska, A.; Paćzek, S.; Guziejko, K.; Choraży, M.; Mroczo, B. Evaluation of Free Light Chains (FLCs) Synthesis in Response to Exposure to SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11589. [CrossRef] [PubMed]
27. Mental Health and COVID-19: Early Evidence of the Pandemic's Impact: Scientific Brief, 2 March 2022. Available online: [https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci\\_Brief-Mental\\_health-2022.1](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-Mental_health-2022.1) (accessed on 29 May 2023).
28. National Institute of Public Health. Ogólnopolskie Badanie Seropidemiologiczne COVID-19: OBSER-CO. Raport końcowy z badania. 2022. Available online: <https://www.pzh.gov.pl/projekty-i-programy/obserco/raporty/> (accessed on 18 February 2024).

29. Hickey, T.E.; Kemp, T.J.; Bullock, J.; Bouk, A.; Metz, J.; Neish, A.; Cherry, J.; Lowy, D.R.; Pinto, L.A. SARS-CoV-2 IgG Spike antibody levels and avidity in natural infection or following vaccination with mRNA-1273 or BNT162b2 vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **2023**, *19*, 2215677. [[CrossRef](#)]
30. Ebinger, J.E.; Fert-Bober, J.; Printsev, I.; Wu, M.; Sun, N.; Prostko, J.C.; Frias, E.C.; Stewart, J.L.; Van Eyk, J.E.; Braun, J.G.; et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 981–984. [[CrossRef](#)]
31. Shrotri, M.; van Schalkwyk, M.C.I.; Post, N.; Eddy, D.; Huntley, C.; Leeman, D.; Rigby, S.; Williams, S.V.; Bermingham, W.H.; Kellam, P.; et al. T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0245532. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

#### 14. Streszczenie w języku polskim

W listopadzie 2019 r. w prowincji Wuhan w Chinach zaobserwowano pacjentów z nietypowym przebiegiem zapalenia płuc oraz powikłaniami wielonarządowymi. Za te zakażenia okazał się odpowiedzialny drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2; *severe acute respiratory syndrom coronavirus*), który doprowadził do globalnej pandemii, ogłoszonej przez Światową Organizację Zdrowia (WHO; *World Health Organization*) w marcu 2020 r. Wirus SARS-CoV-2 zbudowany jest z jednoniciowego RNA oraz białek strukturalnych: białka kolca (S), białka nukleokapsydu (N), białka błonowego (M) oraz białka otoczki (E). Najważniejsze znaczenie kliniczne ma białko S, które łączy się z receptorem dla konwertazy angiotensyny II i tą drogą infekuje komórki gospodarza. Istotne jest również białko N, które pełni funkcję ochronną dla materiału genetycznego wirusa i jest odpowiedzialne za jego replikację. Przeciwciała skierowane przeciwko białku S są produkowane zarówno po immunizacji biernej, jak i czynnej, wykazują też zdolności neutralizujące, to znaczy chroniące przed zakażeniem. Przeciwciała skierowane przeciwko białku N pojawiają się tylko po przebytej infekcji i nie mają zdolności ochronnych.

Stwardnienie rozsiane jest chorobą autoimmunologiczną ośrodkowego układu nerwowego, na którą choruje w Polsce ponad 50 000 osób. Podstawą terapii stwardnienia rozsianego są leki immunomodulacyjne i immunosupresyjne modyfikujące przebieg choroby, które są dostępne dla pacjentów w Polsce w ramach programu lekowego, finansowanego przez Narodowy Fundusz Zdrowia.

Celem pracy doktorskiej była analiza przeciwciał przeciwko białkom S i N wirusa SARS-CoV-2 u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego leczonych wybranymi lekami modyfikującymi przebieg choroby w północno-wschodniej Polsce.

Przed przystąpieniem do badań własnych przeprowadzono analizę dostępnego piśmiennictwa na temat statusu serologicznego pacjentów z chorobami układu nerwowego, którzy przechorowali COVID-19. na tej podstawie przygotowano i opublikowano w recenzowanym czasopiśmie pracę pogładową, która powstała

w celu usystematyzowania aktualnej wiedzy na ten temat w momencie rozpoczęcia badań własnych.

Grupę badaną stanowili pacjenci z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego leczeni wybranymi lekami modyfikującymi przebieg choroby. Większość pacjentów była leczona interferonem beta, octanem glatirameru oraz fumaranem dimetylu.

Podczas etapu I badań oznaczono obecność przeciwciał przeciwko białku S w klasie IgG i IgA (oznaczone dalej jako: IgG-S, IgA-S) oraz przeciwko białku N w klasie IgG (oznaczone dalej jako: IgG-N) wirusa SARS-CoV-2. Obecność przeciwciała IgG-S i IgA-S oceniano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA przy użyciu zestawów anty-SARS-CoV-2 IgA i IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Niemcy). Podczas I etapu oznaczenia laboratoryjne przeprowadzono dwukrotnie (wizyta pierwsza: maj-czerwiec 2020, n=186; wizyta druga: maj-czerwiec 2021 n=88). Podczas II etapu badań oznaczono jakościowo oraz ilościowo przeciwciała przeciwko domenie wiążącej receptor (*receptor binding domain*; RBD) podjednostki S1 wirusa SARS-CoV-2 w klasie IgG (dalej oznaczone jako IgG-S1RBD) oraz przeciwciała przeciwko białku N w klasie IgG metodą chemiluminescencji (CMIA; Abbott, IL, USA). Podczas etapu II oznaczenia laboratoryjne przeprowadzono dwukrotnie (wizyta trzecia; grudzień 2021-luty 2022, n=38; wizyta czwarta: grudzień 2022-luty 2023, n=38).

Po przeprowadzeniu I etapu badań wykazano, że szczepienie istotnie statystycznie indukuje obecność przeciwciał przeciwko białku S (IgG-S i IgG-A), natomiast nie indukuje przeciwciał przeciwko białku N (IgA-S,  $p < 0,0001$ ; IgG-S,  $p < 0,0001$ ; IgG-N  $p = 0,91$ ). Podczas analizy statystycznej wyników etapu II badań wykazano, że obecność przeciwciał neutralizujących IgG-S1RBD u pacjentów zaszczepionych i nieszczepionych nie różniła się istotnie statystycznie (trzecia wizyta:  $p = 0,089$ ; czwarta wizyta  $p = 0,501$ ), natomiast szczepienie istotnie statystycznie zwiększało poziom przeciwciał IgG-S1-RBD (wizyta trzecia  $p < 0,001$  i wizyta czwarta  $p = 0,038$ ). Ponadto, w latach 2022-2023, nie wykazano istotnych różnic co do obecności przeciwciał neutralizujących w grupie pacjentów, którzy przebyli infekcję SARS-CoV-2 potwierdzoną testem

antygenowym lub PCR i w grupie badanych, którzy nie mieli potwierdzonej przebytej infekcji SARS-CoV-2 (wizyta trzecia  $p=0,309$ ; wizyta czwarta  $p=1,0$ ). Osoby, które przebyły potwierdzoną infekcją SARS-CoV-2 (dodatni wynik antygenowy/PCR), miały istotnie statystycznie wyższy poziom przeciwciał IgG-S1RBD podczas wizyty trzeciej ( $p=0,001$ ), nie stwierdzono różnic w poziomach przeciwciał podczas wizyty czwartej ( $p=0,410$ ). Wzrost poziomu przeciwciał neutralizujących u pacjentów bez potwierdzonej przebytej infekcji SARS-CoV-2 wskazuje na szerokie rozprzestrzenienie wirusa w badanej populacji oraz liczne infekcje skąpoobjawowe/bezobjawowe. Stosowane w grupie badanej leki modyfikujące przebieg stwardnienia rozsianego nie miały wpływu na produkcję przeciwciał neutralizujących. Pacjenci z potwierdzoną przebytą infekcją SARS-CoV-2 mieli statystycznie istotnie wyższy poziom przeciwciał IgG-N podczas trzeciej wizyty ( $p=0,040$ ) niż pacjenci COVID (-), nie stwierdzono różnic podczas wizyty 4 ( $p=0,363$ ).

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła wyciągnąć wnioski:

- Pacjenci chorujący na rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego, leczeni intereptonem beta, octanem glatirameru i fumaranem dimetylu są immunokompetentni. Szczepienie przeciwko SARS-CoV-2 w badanych podgrupach pacjentów istotnie indukowało wytwarzanie przeciwciał neutralizujących oraz zwiększało ich poziom.
- Obserwowany, w trakcie kolejnych lat trwania pandemii, wzrost odsetka pacjentów seropozytywnych, którzy nie mieli zdiagnozowanej infekcji i nie zostali zaszczepieni przeciwko SARS-CoV-2 wskazuje na liczne zachorowania skąpoobjawowe/bezobjawowe.
- Nasilenie zapadalności na COVID-19 w grupie badanej, w różnych okresach pandemii, było zbliżone do stwierdzanego w polskiej populacji ogólnej.
- U wszystkich pacjentów z potwierdzoną w przeszłości infekcją SARS-CoV-2 i zaszczepionych na COVID-19 wykazano obecność przeciwciał neutralizujących, co sugeruje, że w badanej grupie pacjentów duże znaczenie dla ochrony przed reinfekcją ma

odporność hybrydowa i wskazuje na celowość szczepienia osób, które przebyły już infekcję SARS-CoV-2.

- Szczepienia ochronne nie wpływają na produkcję przeciwciał przeciwko białku N.



## 15. Streszczenie w języku angielskim

In November 2019, patients with an atypical course of pneumonia and multi-organ complications were observed in Wuhan Province, China. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) was found to be responsible for these infections, leading to a global pandemic declared by the World Health Organisation in March 2020. SARS-CoV-2 is composed of single-stranded RNA and structural proteins: the spike protein (S), the nucleocapsid protein (N), the membrane protein (M) and the envelope protein (E). The most clinically significant is the S protein which binds to the receptor for angiotensin-converting enzyme II and infects host cells via this pathway. The N protein is also important as it serves a protective function for the genetic material of the virus and is responsible for its replication. Antibodies against the S-protein are produced after both passive and active immunisation, and show neutralising abilities, i.e. protecting against infection. Antibodies against the N protein typically develop after natural infection and have no protective abilities.

The course of COVID-19 in multiple sclerosis (MS) patients has been of particular interest since the start of the pandemic. Currently available data indicate that in patients with MS, the course of COVID-19 is not significantly different from that in the general population. MS is an autoimmune disease of the central nervous system with more than 50,000 patients in Poland. The mainstay of MS treatment are disease-modifying therapies (DMTs) which is available to patients in Poland on the National Health Fund.

The aim of the PhD thesis was to analyse antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in patients with the relapsing-remitting form of MS treated with selected DMTs in North East Poland.

Prior to commencement of the research, analysis of the available literature on the serological status of patients with nervous system diseases who had had COVID-19 was performed. Following the analysis, and at the time of starting the study, a review paper that aimed to systematise the existing knowledge on the subject was published in a peer-reviewed journal.

The study group consisted of patients with the relapsing-remitting form of MS treated with selected DMTs. The majority of patients were treated with beta interferon, glatiramer acetate and dimethyle fumarate.

During the first stage of the study, the presence of antibodies against the S protein in IgG and IgA class (hereafter: IgG-S, IgA-S), and against the N protein in IgG class (hereafter: IgG-N) of SARS-CoV-2 was determined. The presence of IgG-S and IgA-S antibodies was assessed by immunoenzymatic ELISA using anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG kits (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Germany). During the first stage of the study, laboratory determinations were performed twice (visit one: May–June 2020, n=186; visit two: May–June 2021 n=88). During the second stage of the study, antibodies against the receptor binding domain (RBD) of the S1 subunit of SARS-CoV-2 in IgG class (hereafter designated as IgG-S1RBD) and antibodies against the N protein in IgG class were determined qualitatively and quantitatively by chemiluminescence (CMIA; Abbott, IL, USA). During the second stage of the study, laboratory determinations were performed twice (visit three; December 2021–February 2022, n=38; visit four: December 2022–February 2023, n=38).

During the first stage of the study, it was demonstrated that vaccination statistically significantly induced the presence of antibodies against the S protein (IgG-S and IgG-A), but did not induce antibodies against the N protein (IgA-S,  $p < 0.0001$ ; IgG-S,  $p < 0.0001$ ; IgG-N  $p = 0.91$ ). Statistical analysis of the results of the second stage of the study demonstrated that vaccination increased the level of IgG-S1RBD (visit three  $p < 0.001$  and visit four  $p = 0.038$ ), while there was no statistically significant difference in the presence of IgG-S1RBD neutralising antibodies in vaccinated and unvaccinated patients (third visit:  $p = 0.089$ ; fourth visit  $p = 0.501$ ). Furthermore, during the second stage of the study (2022–2023), no significant differences were found in the presence of neutralising antibodies between the group of patients who had had SARS-CoV-2 infection confirmed by an antigen or PCR test and the group of patients who had not had a confirmed SARS-CoV-2 infection (third visit  $p = 0.309$ ; fourth visit  $p = 1.0$ ). Study participants who had had SARS-CoV-2 infection (positive antigen/PCR result) had a statistically significantly higher level of IgGS1RBD antibodies during the third visit ( $p = 0.001$ ), but no differences were found in antibody levels during

the fourth visit ( $p=0.410$ ). An increase in the level of neutralising antibodies in patients without a confirmed previous SARS-CoV-2 infection indicates a widespread presence of the virus in the studied population and numerous mildly symptomatic/asymptomatic infections. Patients with a confirmed past SARS-CoV-2 infection had a statistically significantly higher level of IgG-N antibodies on the third visit ( $p=0.040$ ) in comparison to COVID (-) patients, but no differences were found on the fourth visit ( $p=0.363$ ). Drugs modifying the course of MS used in the study group did not affect the production of neutralising antibodies. Analysis of the obtained data allowed us to arrive at the following conclusions:

- Patients suffering from relapsing-remitting MS treated with interferon beta, glatiramer acetate and dimethyl fumarate are immunocompetent. Vaccination against SARS-CoV-2 in the study group significantly induced the production of neutralising antibodies and increased their level.
- The observed increase in the percentage of seropositive patients who had not had a confirmed infection and had not been vaccinated against SARS-CoV-2 during the subsequent years of the pandemic indicates numerous mildly symptomatic/asymptomatic infections. Vaccination did not affect the production of antibodies against the N protein in the study group.
- The overall incidence of COVID-19 infection in the study group at various points during the pandemic was similar to that observed in the general Polish population. All study participants with a confirmed previous SARS-CoV-2 infection and vaccinated against COVID-19 showed the presence of neutralising antibodies, which suggests that hybrid immunity is of great importance for protection against infection in the studied group of patients and indicates the usefulness of vaccinating individuals who have already had SARS-CoV-2 infection.

## 16. Pismiennictwo

1. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733, doi:10.1056/nejmoa2001017.
2. Guan, W.J.; Ni, Z.Y.; Hu, Y.; Liang, W.H.; Ou, C.Q.; He, J.X.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.L.; Hui, D.S.C.; et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, doi:10.1056/NEJMoa2002032.
3. Covid-, B.S. OBSER-CO Raport z I tury badania. **2021**.
4. Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **2020**, *395*, 565–574, doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
5. Kirtipal, N.; Bharadwaj, S.; Kang, S.G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *85*, doi:10.1016/J.MEEGID.2020.104502.
6. Ou, X.; Liu, Y.; Lei, X.; Li, P.; Mi, D.; Ren, L.; Guo, L.; Guo, R.; Chen, T.; Hu, J.; et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/S41467-020-15562-9.
7. Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220, doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
8. Dutta, N.K.; Mazumdar, K.; Gordy, J.T. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *J. Virol.* **2020**, *94*, doi:10.1128/JVI.00647-20.
9. Louapre, C.; Collongues, N.; Stankoff, B.; Giannesini, C.; Papeix, C.; Bensa, C.; Deschamps, R.; Créange, A.; Wahab, A.; Pelletier, J.; et al. Clinical Characteristics and Outcomes in Patients with Coronavirus Disease 2019 and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **2020**, *77*, 1079–1088, doi:10.1001/jamaneurol.2020.2581.

10. Wu, C.; Chen, X.; Cai, Y.; Xia, J.; Zhou, X.; Xu, S.; Huang, H.; Zhang, L.; Zhou, X.; Du, C.; et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* **2020**, doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994.
11. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
12. Luo, W.; Liu, X.; Bao, K.; Huang, C. Ischemic stroke associated with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol.* **2022**, *269*, 1731–1740, doi:10.1007/S00415-021-10837-7.
13. Czarnowska, A.; Zajkowska, J.; Kułakowska, A. Impact of SARS-CoV-2 on the nervous system. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2023**, *57*, 26–35, doi:10.5603/PJNNS.A2023.0009.
14. Águila-Gordo, D.; Manuel Flores-Barragán, J.; Ferragut-Lloret, F.; Portela-Gutierrez, J.; LaRosa-Salas, B.; Porrás-Leal, L.; Carlos Villa Guzmán, J. Acute myelitis and SARS-CoV-2 infection. A new etiology of myelitis? *J. Clin. Neurosci.* **2020**, *80*, 280–281, doi:10.1016/j.jocn.2020.07.074.
15. Mondal, R.; Ganguly, U.; Deb, S.; Shome, G.; Pramanik, S.; Bandyopadhyay, D.; Lahiri, D. Meningoencephalitis associated with COVID-19: a systematic review. *J. Neurovirol.* **2020**.
16. Łoś, K.; Kulikowska, J.; Waszkiewicz, N. The Impact of the COVID-19 Virus Pandemic on the Incidence of First Psychotic Spectrum Disorders. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, doi:10.3390/IJERPH19073781.
17. Carrillo-Larco, R.M.; Altez-Fernandez, C.; Ravaglia, S.; Vizcarra, J.A. COVID-19 and Guillain-Barre Syndrome: A systematic review of case reports. *Wellcome Open Res.* **2020**, *5*, doi:10.12688/wellcomeopenres.15987.2.
18. Gklinos, P. Neurological manifestations of COVID-19: a review of what we know so far. *J. Neurol.* **2020**, *267*, 2485–2489.
19. Percze, A.R.; Nagy, A.; Polivka, L.; Barczy, E.; Czaller, I.; Kovats, Z.; Varga, J.T.; Ballai, J.H.; Muller, V.; Horvath, G. Fatigue, sleepiness and

- sleep quality are SARS-CoV-2 variant independent in patients with long COVID symptoms. *Inflammopharmacology* **2023**, *31*, 2819–2825, doi:10.1007/S10787-023-01190-4.
20. Chowdhury, M.A.; Hossain, N.; Kashem, M.A.; Shahid, M.A.; Alam, A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health* 2020, *13*, 1619–1629.
  21. Shrotri, M.; van Schalkwyk, M.C.I.; Post, N.; Eddy, D.; Huntley, C.; Leeman, D.; Rigby, S.; Williams, S. V.; Bermingham, W.H.; Kellam, P.; et al. T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* **2021**, *16*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0245532.
  22. Melenotte, C.; Silvin, A.; Goubet, A.G.; Lahmar, I.; Dubuisson, A.; Zumla, A.; Raoult, D.; Merad, M.; Gachot, B.; Hénon, C.; et al. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncoimmunology* 2020, *9*.
  23. Stadlbauer, D.; Amanat, F.; Chromikova, V.; Jiang, K.; Strohmeier, S.; Arunkumar, G.A.; Tan, J.; Bhavsar, D.; Capuano, C.; Kirkpatrick, E.; et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2020**, *57*, doi:10.1002/cpmc.100.
  24. McAndrews, K.M.; Dowlatshahi, D.P.; Dai, J.; Becker, L.M.; Hensel, J.; Snowden, L.M.; Leveille, J.M.; Brunner, M.R.; Holden, K.W.; Hopkins, N.S.; et al. Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight* **2020**, *5*, doi:10.1172/JCI.INSIGHT.142386.
  25. Long, Q.X.; Liu, B.Z.; Deng, H.J.; Wu, G.C.; Deng, K.; Chen, Y.K.; Liao, P.; Qiu, J.F.; Lin, Y.; Cai, X.F.; et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 845–848, doi:10.1038/s41591-020-0897-1.
  26. Xiang, F.; Wang, X.; He, X.; Peng, Z.; Yang, B.; Zhang, J.; Zhou, Q.; Ye, H.; Ma, Y.; Li, H.; et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 1930–1934, doi:10.1093/cid/ciaa461.
  27. Guo, L.; Ren, L.; Yang, S.; Xiao, M.; Chang, D.; Yang, F.; Dela Cruz, C.S.; Wang, Y.; Wu, C.; Xiao, Y.; et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.*

2020, doi:10.1093/cid/ciaa310.

28. Hickey, T.E.; Kemp, T.J.; Bullock, J.; Bouk, A.; Metz, J.; Neish, A.; Cherry, J.; Lowy, D.R.; Pinto, L.A. SARS-CoV-2 IgG Spike antibody levels and avidity in natural infection or following vaccination with mRNA-1273 or BNT162b2 vaccines. **2023**, doi:10.1080/21645515.2023.2215677.
29. Li, K.; Huang, B.; Wu, M.; Zhong, A.; Li, L.; Cai, Y.; Wang, Z.; Wu, L.; Zhu, M.; Li, J.; et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41467-020-19943-y.
30. Gruell, H.; Vanshylla, K.; Weber, T.; Barnes, C.O.; Kreer, C.; Klein, F. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. *Immunity* **2022**, *55*, 925, doi:10.1016/J.IMMUNI.2022.05.005.
31. Okba, N.M.A.; Muller, M.A.; Li, W.; Wang, C.; GeurtsvanKessel, C.H.; Corman, V.M.; Lamers, M.M.; Sikkema, R.S.; Bruin, E. de; Chandler, F.D.; et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv* **2020**, doi:10.1101/2020.03.18.20038059.
32. Flores-Gonzalez, R.E.; Hernandez, J.; Tornes, L.; Rammohan, K.; Delgado, S. Development of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in a relapsing multiple sclerosis patient on ofatumumab. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, *49*.
33. Feikin, D.R.; Higdon, M.M.; Abu-Raddad, L.J.; Andrews, N.; Araos, R.; Goldberg, Y.; Groome, M.J.; Huppert, A.; O'Brien, K.L.; Smith, P.G.; et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet (London, England)* **2022**, *399*, 924–944, doi:10.1016/S0140-6736(22)00152-0.
34. Stellini, R.; Gianello, R.; Gomasasca, W. Durability of anti-spike antibodies after vaccination with mRNA SARS-CoV-2 vaccine is longer in subjects with previous infection: could the booster dose be delayed? *Infection* **2022**, *50*, 1573–1577, doi:10.1007/S15010-022-01816-9.
35. Bobrovitz, N.; Ware, H.; Ma, X.; Li, Z.; Hosseini, R.; Cao, C.; Selemon, A.; Whelan, M.; Premji, Z.; Issa, H.; et al. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron

- variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet. Infect. Dis.* **2023**, *23*, 556–567, doi:10.1016/S1473-3099(22)00801-5.
36. Bergeri, I.; Lewis, H.C.; Subissi, L.; Nardone, A.; Valenciano, M.; Cheng, B.; Glonti, K.; Williams, B.; Abejirinde, I.O.O.; Simniceanu, A.; et al. Early epidemiological investigations: World Health Organization UNITY protocols provide a standardized and timely international investigation framework during the COVID-19 pandemic. *Influenza Other Respi. Viruses* **2022**, *16*, 7–13, doi:10.1111/IRV.12915.
37. National Institute of Public Health, P. Ogólnopolskie Badanie Seroepidemiologiczne COVID-19: OBSER-CO. Raport końcowy z badania. **2022**.
38. Capasso, N.; Palladino, R.; Montella, E.; Pennino, F.; Lanzillo, R.; Carotenuto, A.; Petracca, M.; Iodice, R.; Iovino, A.; Aruta, F.; et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Multiple Sclerosis: The Hidden Part of the Iceberg. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 4066, doi:10.3390/jcm9124066.
39. Kapica-Topczewska, K.; Collin, F.; Tarasiuk, J.; Chorąży, M.; Czarnowska, A.; Kwaśniewski, M.; Broła, W.; Bartosik-Psujek, H.; Adamczyk-Sowa, M.; Kochanowicz, J.; et al. Clinical and epidemiological characteristics of multiple sclerosis patients receiving disease-modifying treatment in Poland. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2020**, *54*, 161–168, doi:10.5603/PJNNS.A2020.0020.
40. Kapica-Topczewska, K.; Broła, W.; Fudala, M.; Tarasiuk, J.; Chorazy, M.; Snarska, K.; Kochanowicz, J.; Kulakowska, A. Prevalence of multiple sclerosis in Poland. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2018**, *21*, 51–55, doi:10.1016/j.msard.2018.02.016.
41. Armangue, T.; Spatola, M.; Vlagea, A.; Mattozzi, S.; Cárceles-Cordon, M.; Martinez-Heras, E.; Llufríu, S.; Muchart, J.; Erro, M.E.; Abaira, L.; et al. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 760–772, doi:10.1016/S1474-4422(18)30244-8.
42. Bergmann, C.; Becker, S.; Watts, A.; Sullivan, C.; Wilken, J.; Golan, D.; Zarif, M.; Bumstead, B.; Buhse, M.J.; Kaczmarek, O.; et al. Multiple



- sclerosis and quality of life: The role of cognitive impairment on quality of life in people with multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2023**, *79*, doi:10.1016/J.MSARD.2023.104966.
43. Kurtzke, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **1983**, doi:10.1212/wnl.33.11.1444.
  44. McNicholas, N.; Hutchinson, M.; McGuigan, C.; Chataway, J. 2017 McDonald diagnostic criteria: A review of the evidence. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2018**, *24*, 48–54, doi:10.1016/J.MSARD.2018.05.011.
  45. Kapica-Topczewska, K.; Tarasiuk, J.; Chorąży, M.; Czarnowska, A.; Broła, W.; Szczepański, M.; Kochanowicz, J.; Kułakowska, A. The epidemiology of comorbidities among multiple sclerosis patients in northeastern Poland. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *41*, doi:10.1016/J.MSARD.2020.102051.
  46. Calvi, A.; Haider, L.; Prados, F.; Tur, C.; Chard, D.; Barkhof, F. In vivo imaging of chronic active lesions in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2022**, *28*, 683–690, doi:10.1177/1352458520958589.
  47. Wildner, P.; Stasiołek, M.; Matysiak, M. Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *37*, doi:10.1016/J.MSARD.2019.101452.
  48. Cruz Rivera, S.; Aiyegbusi, O.L.; Piani Meier, D.; Dunne, A.; Harlow, D.E.; Henke, C.; Kamudoni, P.; Calvert, M.J. The effect of disease modifying therapies on fatigue in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2023**, *79*, doi:10.1016/J.MSARD.2023.105065.
  49. Giovannoni, G.; Tomic, D.; Bright, J.R.; Havrdová, E. “No evident disease activity”: The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2017**, *23*, 1179–1187, doi:10.1177/1352458517703193.
  50. Hunter, S.F.; Bowen, J.D.; Reder, A.T. The direct effects of fingolimod in the central nervous system: Implications for relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* **2016**, *30*, 135–147.
  51. Bellucci, G.; Albanese, A.; Rizzi, C.; Rinaldi, V.; Salvetti, M.; Ristori, G. The value of Interferon  $\beta$  in multiple sclerosis and novel opportunities for its anti-viral activity: a narrative literature review. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/FIMMU.2023.1161849.

52. Kasindi, A.; Fuchs, D.T.; Koronyo, Y.; Rentsendorj, A.; Black, K.L.; Koronyo-hamaoui, M. Glatiramer Acetate Immunomodulation: Evidence of Neuroprotection and Cognitive Preservation. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS11091578.
53. Blair, H.A. Dimethyl Fumarate: A Review in Relapsing-Remitting MS. *Drugs* **2019**, *79*, 1965–1976, doi:10.1007/S40265-019-01229-3.
54. Scott, L.J. Teriflunomide: A Review in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Drugs* **2019**, *79*, 875–886, doi:10.1007/S40265-019-01135-8.
55. McGinley, M.P.; Cohen, J.A. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. *Lancet (London, England)* **2021**, *398*, 1184–1194, doi:10.1016/S0140-6736(21)00244-0.
56. Kappos, L.; Bar-Or, A.; Cree, B.A.C.; Fox, R.J.; Giovannoni, G.; Gold, R.; Vermersch, P.; Arnold, D.L.; Arnould, S.; Scherz, T.; et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet (London, England)* **2018**, *391*, 1263–1273, doi:10.1016/S0140-6736(18)30475-6.
57. Giovannoni, G.; Soelberg Sorensen, P.; Cook, S.; Rammohan, K.; Rieckmann, P.; Comi, G.; Dangond, F.; Adeniji, A.K.; Vermersch, P. Safety and efficacy of cladribine tablets in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Results from the randomized extension trial of the CLARITY study. *Mult. Scler.* **2018**, *24*, 1594–1604, doi:10.1177/1352458517727603.
58. Sirbu, C.A.; Budisteanu, M.; Falup-Pecurariu, C. Monoclonal antibodies — a revolutionary therapy in multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2020**, *54*, 21–27, doi:10.5603/PJNNS.A2020.0008.
59. Milo, R. Ofatumumab – A Potential Subcutaneous B-cell Therapy for Relapsing Multiple Sclerosis. *Eur. Neurol. Rev.* **2020**, *15*, 27–35, doi:10.17925/ENR.2020.15.1.27.
60. Lamb, Y.N. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs* **2022**, *82*, 323–334, doi:10.1007/S40265-022-01672-9.
61. Sormani, M.P.; Schiavetti, I.; Landi, D.; Carmisciano, L.; De Rossi, N.; Cordioli, C.; Moiola, L.; Radaelli, M.; Immovilli, P.; Capobianco, M.; et al. SARS-CoV-2 serology after COVID-19 in multiple sclerosis: An international cohort study. *Mult. Scler.* **2021**,

doi:10.1177/13524585211035318.

62. Peeters, L.M.; Parciak, T.; Walton, C.; Geys, L.; Moreau, Y.; De Brouwer, E.; Raimondi, D.; Pirmani, A.; Kalincik, T.; Edan, G.; et al. COVID-19 in people with multiple sclerosis: A global data sharing initiative. *Mult. Scler.* **2020**, *26*, 1157–1162, doi:10.1177/1352458520941485.
63. Kreye, J.; Reincke, S.M.; Prüss, H. Do cross-reactive antibodies cause neuropathology in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 645–646.
64. Zabalza, A.; Cárdenas-Robledo, S.; Tagliani, P.; Arrambide, G.; Otero-Romero, S.; Carbonell-Mirabent, P.; Rodríguez-Barranco, M.; Rodríguez-Acevedo, B.; Restrepo Vera, J.L.; Resina-Salles, M.; et al. COVID-19 in multiple sclerosis patients: susceptibility, severity risk factors and serological response. *Eur. J. Neurol.* **2020**, doi:10.1111/ene.14690.
65. Berger, J.R.; Brandstadter, R.; Bar-Or, A. COVID-19 and MS disease-modifying therapies. *Neurol. Neuroimmunol. neuroinflammation* **2020**, *7*, doi:10.1212/NXI.0000000000000761.
66. Willis, M.D.; Robertson, N.P. Multiple sclerosis and the risk of infection: considerations in the threat of the novel coronavirus, COVID-19/SARS-CoV-2. *J. Neurol.* **2020**.
67. Czarnowska, A.; Broła, W.; Zajkowska, O.; Rusek, S.; Adamczyk-Sowa, M.; Kubicka-Bączek, K.; Kalinowska-Łyszczarz, A.; Kania, K.; Słowik, A.; Wnuk, M.; et al. Clinical course and outcome of SARS-CoV-2 infection in multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies — the Polish experience. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2021**, *55*, 212–222, doi:10.5603/PJNNS.A2021.0031.
68. Chilimuri, S.; Mantri, N.; Gongati, S.; Zahid, M.; Sun, H. COVID-19 Vaccine Failure in a Patient with Multiple Sclerosis on Ocrelizumab. *Vaccines* **2021**, *9*, 1–3, doi:10.3390/VACCINES9030219.
69. Sormani, M.P.; Schiavetti, I.; Carmisciano, L.; Inglese, M.; Laroni, A.; Lapucci, C.; Uccelli, A.; Inglese, M.; Da Rin, G.; Serrati, C.; et al. Effect of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in MS patients treated with disease modifying therapies. *EBioMedicine* **2021**, *72*, doi:10.1016/J.EBIOM.2021.103581.
70. Tallantyre, E.C.; Vickaryous, N.; Anderson, V.; Asardag, A.N.; Baker, D.; Bestwick, J.; Bramhall, K.; Chance, R.; Evangelou, N.; George, K.; et al.

COVID-19 Vaccine Response in People with Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **2022**, *91*, 89–100, doi:10.1002/ANA.26251.

71. Czarnowska, A.; Tarasiuk, J.; Zajkowska, O.; Wnuk, M.; Marona, M.; Nowak, K.; Słowika, A.; Jamroz-Wisniewska, A.; Rejdak, K.; Lech, B.; et al. Safety of Vaccines against SARS-CoV-2 among Polish Patients with Multiple Sclerosis Treated with Disease-Modifying Therapies. *Vaccines* **2022**, *10*, 1–11, doi:10.3390/vaccines10050763.

## 17. Zgoda Komisji Bioetycznej

**KOMISJA BIOETYCZNA PRZY  
UNIwersYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08  
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, 25.06.2020 r.

Uchwała nr: APK.002.230.2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena syntezy przeciwciał IgG, IgM, IgA przeciwko SARS-CoV-2 w wybranych chorobach neurozwyrodnieniowych” przez prof. dr hab. Barbarę Mroczko wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka



## 18. Oświadczenia współautorów

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis-A Literature Review” Kulikowska J, Kulczyńska-Przybik A, Mroczo B, Kułakowska A.. Int J Mol Sci. 2021 May 31;22(11):5894. doi: 10.3390/ijms22115894. PMID: 34072715; PMCID: PMC8199258.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Joanna Kulikowska	Opracowanie koncepcji, metodologii, przegląd i analiza literatury, przygotowanie manuskryptu.
Agnieszka Kulczyńska-Przybik	Opracowaniu koncepcji, metodologii, danych źródłowych publikacji oraz ocena i nadzorowanie merytoryczne i przygotowywanie publikacji.
Barbara Mroczo	Opracowanie koncepcji, danych źródłowych publikacji oraz nadzorowanie merytoryczne przygotowywania publikacji.
Alina Kułakowska	Opracowanie koncepcji, danych źródłowych publikacji oraz nadzorowanie merytoryczne i administracyjne przygotowywania publikacji.

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Joanny Kulikowskiej

Podpis kandydata

Joanna Kulikowska  
LEKARZ  
3707423

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora

Agnieszka Kulczyńska-Przybik

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25.03.2024

*miejsowość, data*

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review*”, autorów Joanna Kulikowska, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Barbara Mroczo, Alina Kułakowska, opublikowanej w *International Journal of Molecular Science*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji, metodologii, danych źródłowych publikacji oraz ocenie i nadzorowaniu merytorycznym i administracyjnym przygotowywania publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Agnieszka Kulczyńska-Przybik  
[Podpis]

Barbara Mroczo

imię i nazwisko współautora

Białystok, 25.04.2024

miejsowość, data

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review*”, autorów Joanna Kulikowska, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Barbara Mroczo, Alina Kułakowska, opublikowanej w *International Journal of Molecular Science*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SARS-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji, danych źródłowych publikacji oraz nadzorowaniu merytorycznym przygotowywania publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIEROWNIK  
Zakładu Diagnostyki  
Chorób Neurodegeneracyjnych  
prof. dr hab. med. Barbara Mroczo



Alina Kułakowska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 14.03.24

*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review*”, autorów Joanna Kulikowska, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Barbara Mroczo, Alina Kułakowska, opublikowanej w *International Journal of Molecular Science*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji, danych źródłowych publikacji oraz nadzorowaniu merytorycznym i administracyjnym przygotowywania publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Alina Kułakowska

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

**„Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies”** Kulikowska Joanna, Czarnowska Agata, Gudowska-Sawczuk Monika, Kulczyńska-Przybik Agnieszka, Bazylewicz Marcin, Collins Francois, Chorąży Monika, Mroczko Barbara, Kochanowicz Jan, Kapica-Topczewska Katarzyna, Kułakowska Alina.; *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, vol. 57, no. 1, 2023, pp. 121-130, DOI:10.5603/PJNNS.a2022.0067

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Joanna Kulikowska	Projektowanie, metodologia, administracja projektu, formalna analiza i selekcja danych, zebranie materiału badawczego, przeprowadzenie badań przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu.
Agata Czarnowska	Projektowanie, przeprowadzanie badań, analiza bazy danych i uzyskanych wyników oraz współtworzenie manuskryptu.
Monika Gudowska-Sawczuk	Projektowanie przeprowadzonych badań, analiza bazy danych i uzyskanych wyników oraz współtworzenie manuskryptu.
Agnieszka Kulczyńska-Przybik	Planowanie i przeprowadzanie opublikowanych badań oraz selekcja i analiza zebranych danych i bibliografii, współtworzenie oryginalnego manuskryptu.
Marcin Bazylewicz	Formalna analiza danych, w tym bazy danych oraz współtworzenie oryginalnego manuskryptu.
Francois Collins	Tworzenie bazy danych, analiza statystyczna zebranych danych oraz współtworzenie oryginalnego manuskryptu.
Monika Chorąży	Analiza i selekcja zgromadzonych danych i bibliografii oraz uczestnictwo w edycji manuskryptu.
Barbara Mroczko	Opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, edycja manuskryptu oraz nadzór merytoryczny.

Jan Kochanowicz	Analiza uzyskanych danych, edycja manuskryptu, pozyskanie finansowania oraz nadzór merytoryczny.
Katarzyna Kapica-Topczewska	Nadzorowanie przeprowadzonych badań, analizie danych oraz ocena merytoryczna oraz edycja oryginalnego manuskryptu.
Alina Kulakowska	Opracowanie koncepcji przeprowadzonych badań, analiza uzyskanych danych wyników, pozyskanie finansowania, ocena i edycja manuskryptu oraz nadzór merytorycznym nad przeprowadzanymi badaniami i procesem publikacji.

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Joanny Kulikowskiej

Podpis kandydata

*Joanna Kulikowska*  
 Joanna Kulikowska  
 LEKARZ  
 3707428

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

*A. Kędziorek*  
 Podpis promotora

Alina Kułakowska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 14.03.24

*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review*”, autorów Joanna Kulikowska, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Barbara Mroczko, Alina Kułakowska, opublikowanej w *International Journal of Molecular Science*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji, danych źródłowych publikacji oraz nadzorowaniu merytorycznym i administracyjnym przygotowywania publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Alina Kułakowska

Agnieszka Kulczyńska-Przybik

*imię i nazwisko współautora*

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

Białystok, 25.03.2024

*miejsowość, data*

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*The Significance of COVID-19 Immunological Status in Severe Neurological Complications and Multiple Sclerosis—A Literature Review*”, autorów Joanna Kulikowska, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Barbara Mroczo, Alina Kułakowska, opublikowanej w *International Journal of Molecular Science*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji, metodologii, danych źródłowych publikacji oraz ocenie i nadzorowaniu merytorycznym i administracyjnym przygotowywania publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Agnieszka Kulczyńska-Przybik  
[Podpis]

Alina Kułakowska

*imię i nazwisko współautora*

B-260 14.03.24

*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozсіяnym*” polegał na conceptualizacji przeprowadzonych badań, walidacji uzyskanych danych wyników, pozyskaniu finansowania, ocenie i edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym nad przeprowadzanymi badaniami i procesem publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Alina Kułakowska

Barbara Mroczo

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25.04.2024  
*miejsowość, data*

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich metodologii, edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIEROWNIK  
Zakład Diagnostyki  
Chorób Neurozwyrodnieniowych  
*mgr. dr hab. med. Barbara Mroczo*

Marcin Bazylewicz

*imię i nazwisko współautora*

Białystok 25.04.2024

*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na na formalnej analizie danych, w tym bazy danych oraz współtowrzeniu oryginalnego manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Marcin Bazylewicz



Monika Choraży

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25. 04. 2024  
*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Choraży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozсіяnym” polegał na analizie i selekcji zgromadzonych danych i bibliografii oraz uczestnictwie w edycji manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Monika Choraży*

Agata Czarnowska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25. 04. 2024  
*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Neurologii i Neurochirurgii Polskiej*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na projektowaniu przeprowadzonych badań, analizie bazy danych i uzyskanych wyników oraz współtworzeniu manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

dr n. med. Agata Czarnowska  
specjalista neurolog  
3126933

Monika Gudowska-Sawczuk

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25.04.2024

*miejsowość, data*

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym” polegał na projektowaniu przeprowadzonych badań, analizie bazy danych i uzyskanych wyników oraz współtworzeniu manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Monika Gudowska-Sawczuk

Francois Collins

*imię i nazwisko współautora*

Tychy, 03.06.2024  
*miejsowość, data*

niezależny konsultant statystyczny  
*nazwa jednostki*

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym” polegał na tworzeniu bazy danych, analizie statystycznej zebranych danych oraz współtworzeniu oryginalnego manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



[Podpis]

Alina Kułakowska

imię i nazwisko współautora

B-260 14.03.24

miejsowość, data

Klinika Neurologii

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w Neurologii i Neurochirurgii Polskiej, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na konceptualizacji przeprowadzonych badań, walidacji uzyskanych danych wyników, pozyskaniu finansowania, ocenie i edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym nad przeprowadzanymi badaniami i procesem publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Alina Kułakowska

Katarzyna Kapica-Topczewska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25.04.2024  
*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Antibodies against SARS-CoV-2 S and N proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with disease-modifying therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Agata Czarnowska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Francois Collins, Monika Chorąży, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Katarzyna Kapica-Topczewska, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Neurologii i Neurochirurgii Polskiej*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozсіяnym*” polegał na nadzorowaniu przeprowadzonych badań, analizie danych oraz ocenie merytorycznej oraz edycji oryginalnego manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Katarzyna Kapica-Topczewska*

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

**"Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies"** Kulikowska, Joanna, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, and et al. 2024. *Vaccines* 12, no. 3: 255. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030255>

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
Joanna Kulikowska	Projektowanie, metodologia, zbieranie materiału, przeprowadzenie badań, formalna analiza i selekcja danych, przegląd literatury, przygotowanie oryginalnego manuskryptu.
Katarzyna Kapica-Topczewska	Projektowanie i nadzorowanie przeprowadzonych badań, analiza danych oraz współtworzenie oryginalnego manuskryptu.
Monika Gudowska-Sawczuk	Zaplanowanie i realizacja części metodologicznej i laboratoryjnej przeprowadzonych badań oraz selekcja i analiza zebranych danych, współtworzenie manuskryptu.
Agnieszka Kulczyńska-Przybik	Planowanie, przeprowadzanie opublikowanych badań oraz analiza zebranych danych i bibliografii, współtworzenie manuskryptu.
Marcin Bazylewicz	Analizie danych, w tym bazy danych, współtworzenie manuskryptu.
Anna Mirończuk	Analiza danych, w tym bazy danych, współtworzenie manuskryptu.
Agata Czarnowska	Przeprowadzenie opublikowanych badań oraz selekcja zebranych danych, edycja manuskryptu.
Waldemar Broła	Analiza i selekcja zgromadzonych danych i bibliografii oraz uczestnictwo w edycji manuskryptu.
Barbara Mroczko	Opracowanie koncepcji badań i ich metodologii, edycja manuskryptu oraz nadzór merytoryczny.

Jan Kochanowicz	Analiza uzyskanych danych, edycja manuskryptu, pozyskanie finansowania oraz nadzór merytorycznym
Alina Kulakowska	Opracowanie koncepcji badań, walidacja uzyskanych danych wyników, pozyskanie finansowania, ocena i edycja manuskryptu oraz nadzór merytoryczny nad przeprowadzanymi badaniami i procesem publikacji.

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Joanny Kulikowskiej

Podpis kandydata

*Joanna Kulikowska*  
 Joanna Kulikowska  
 LEKARZ  
 3707428

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

*A. Kubiś*

Podpis promotora



Katarzyna Kapica-Topczewska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25-01-2024  
*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na projektowaniu i nadzorowaniu przeprowadzonych badań, analizie danych oraz współtworzeniu oryginalnego manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

*Kapica-Topczewska*

Agata Czarnowska

*imię i nazwisko współautora*

Białystok, 25.04.2024  
*miejsowość, data*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na udziale w przeprowadzeniu opublikowanych badań, selekcji zebranych danych oraz edycji manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr n. med. Agata Czarnowska  
specjalista neurolog  
31260953

[Podpis]

Barbara Mroczo

imię i nazwisko współautora

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

Białystok, 25.04.2020r.

miejsowość, data

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich metodologii, edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIEROWNIK  
Zakładu Diagnostyki  
Chorób Neurozwyrodnieniowych  
prof. dr hab. med. Barbara Mroczo

Marcin Bazylewicz

imię i nazwisko współautora

Białystok, 25.04.2021.  
miejsowość, data

Klinika Neurologii

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym leczonych*” polegał na analizie danych, w tym bazy danych, współtworzeniu manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Marcin Bazylewicz

Waldemar Broła

imię i nazwisko współautora

Kielce, 25.03.2024

miejsowość, data

Collegium Medicum, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
nazwa jednostki

Al. IX Wieków  
19, 25-317 Kielce, Polska

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na analizie i selekcji zgromadzonych danych i bibliografii oraz uczestnictwie w edycji manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



[Podpis]

Anna Mirończuk

imię i nazwisko współautora

Białystok 25. Okt 2020 r.

miejsowość, data

Klinika Neurologii

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na analizie danych, w tym bazy danych oraz współtworzenie manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]  
Anna Mirończuk  
specjalista neurolog  
332 832 109

Monika Gudowska-Sawczuk

imię i nazwisko współautora

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

Białystok, 25. 04. 2021

miejsowość, data

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym leczonych*” polegał na zaplanowaniu i realizacji części metodologicznej i laboratoryjnej przeprowadzonych badań oraz selekcji i analizie zebranych danych, współtworzeniu manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Monika Gudowska-Sawczuk

Alina Kułakowska

imię i nazwisko współautora

Białystok, 14.03.20

miejsowość, data

Klinika Neurologii

nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczo, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na konceptualizacji przeprowadzonych badań, walidacji uzyskanych danych, wyników, pozyskaniu finansowania, ocenie i edycji manuskryptu oraz nadzorze merytorycznym nad przeprowadzanymi badaniami i procesem publikacji. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Alina Kułakowska



Agnieszka Kulczyńska-Przybik

*imię i nazwisko współautora*

Zakład Diagnostyki Biochemicznej

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

Białystok, 25. 04. 2024

*miejsowość, data*

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, , Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym leczonych*” polegał na zaplanowaniu, współprowadzeniu badań, analizie zebranych danych i bibliografii, współtworzeniu manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Agnieszka Kulczyńska-Przybik  
[Podpis]

Jan Kochanowicz

*imię i nazwisko współautora*

Klinika Neurologii

*nazwa jednostki*

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. J. Kilińskiego 1  
15-089 Białystok

Białystok 25.04.2020.

*miejsowość, data*

#### Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji: „*Analysis of the Presence and Levels of IgG Antibodies Directed against the S1 Protein Receptor Binding Domain and the N Protein of SARS-CoV-2 in Patients with Multiple Sclerosis Treated with Immunomodulatory Therapies*” autorów Joanna Kulikowska, Katarzyna Kapica-Topczewska, Monika Gudowska-Sawczuk, Agnieszka Kulczyńska-Przybik, Marcin Bazylewicz, Anna Mirończuk, Agata Czarnowska, Waldemar Broła, Barbara Mroczko, Jan Kochanowicz, Alina Kułakowska, opublikowanej w *Vaccines*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „*Analiza przeciwciał przeciwko białku N i S wirusa SAR-CoV-2 u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym*” polegał na walidacji uzyskanych danych, pozyskaniu finansowania oraz nadzorze merytorycznym. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Joannę Kulikowską publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

**KIEROWNIK  
KLINIKI NEUROLOGII**

*prof. dr hab. n. med. Jan Kochanowicz*