



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**Медицински факултет  
Катедра по клинична имунология**

---

**Д-р Виктория Данаилова Пенчева**

**Антителен отговор към RBD-участъка на  
SARS-CoV-2 при ваксинирани,  
преболедували и ваксинирани след  
боледуване индивиди**

**АВТОРЕФЕРАТ**

*на дисертационен труд за придобиване на  
образователна и научна степен „ДОКТОР“*

в докторска програма по „Имунология“, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт 7.1. Медицина

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Снежина Михайлова Кандиларова, дм

**София  
2024**



## **Списък на използваните съкращения:**

### На латиница:

ACE2 – Angiotensin-converting enzyme 2  
CD – Cluster of differentiation  
ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay  
ELFA - Enzyme-linked fluorescence assay FITC - Fluorescein isothiocyanate  
FP - Fusion peptide  
HLA – Human leucocyte antigen  
HRP - Horseradish peroxidase  
IFN – Interferon  
Ig – Immunoglobulin  
IL – Interleukin  
LFIA - Lateral-flow immunoassay  
MASP - Mannose – binding protein associated protease  
MERS - Middle East respiratory syndrome  
NK – Natural killer  
NLR- Nod-like receptor  
OD – Optical density  
PAMPs - Patogen Associated Molecular Patterns  
PPRs - Pattern Recognition Receptors RBD – Receptor binding domain  
RFV -Relative fluorescence value  
RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction  
SARS – severe acute respiratory syndrome  
Tfh - helper T-follicular cells  
Th – T helper cells  
TLR - Toll like receptors  
TMPRSS2 - Transmembrane serine protease 2  
TNF- $\alpha$  - Tumor necrosis factor –  $\alpha$   
VNAb – Virus neutralizing antibodies

### На кирилица:

РНК – рибонуклеинови киселини  
ГКТС – Главен комплекс на тъканна съвместимост  
иРНК – информационна РНК

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Реакцията на организма към носители на чужда генетична информация се осъществява чрез два вида механизми на защита – естествения (вроден) имунитет и придобития (адаптивен) имунитет. Придобитият имунитет включва клетъчни и хуморални фактори. Хуморалният имунен отговор се осъществява чрез производството на имуноглобулини (антитела) от В – лимфоцитите и е важен компонент от имунната защита на организма поради неговите характерни особености като специфичност и изграждане на имунологична памет. Освен това антителата проявяват различни функции като опсонизация, аглутинация, свързване на комплемента, антияло-зависима клетъчна медирана цитотоксичност и неутрализация. Изграждането на антителния имунен отговор може да се повлияе от различни фактори като естеството на патогена, начина на придобиването на имунния отговор и различни фактори от страна на макроорганизма.

През декември 2019 г. в Ухан, Китай беше идентифициран нов коронавирус, наречен SARS-CoV-2, а заболяването, което причинява - COVID-19. SARS-CoV-2 се характеризира с висока степен на трансмисивност, което доведе до бързото му разпространение.

След началото на пандемията от SARS-CoV-2 започнаха редица проучвания относно динамиката и продължителността на имунния отговор след инфекция с цел оценка на разпространението на вируса и риска от ре-инфекции. Значителните социални, здравни и икономически щети и липсата на специфично лечение наложиха ваксинацията като основна насока в противоепидемичните мерки, свързани с ограничаване разпространението на вируса. За целта бяха разработени, одобрени и приложени няколко вида ваксини, като с особен интерес бе проследен имунният отговор и неговата продължителност след ваксинация с цел оценка на ефективността на въведените ваксини и риска от развитие на „пробивни инфекции“. В последствие започна прилагането и на бустерни дози с цел повишаване на ефективността към различните мутации на вируса.

Така сред популацията се оформиха няколко групи индивиди с хуморален имунитет, придобит по различни начини. При едни – естествено придобит, при други – ваксинационен, а при трети – хибриден, т.е. придобит и чрез боледуване и чрез ваксинация, без значение от реда на поява на събитията.

Въпреки големия научен интерес относно хуморалния имунитет към SARS-CoV-2, придобит по различните начини, малко проучвания

включват едновременното проследяване на различни групи за продължителен период от време.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **2.1. Цел**

**Целта** на настоящия дисертационен труд е да се проследи хуморалния имунен отговор към SARS-CoV-2 при преболедували индивиди и при ваксинирани в зависимост от пре-вакцинационния статус.

### **2.2. Задачи**

За постигането на целта си поставихме следните **задачи**:

1. Проследяване концентрациите на антителата при преболедували за период от 12 месеца:  
Изследване на антитела от клас IgG;  
Изследване на антитела от клас IgA;  
Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
2. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани неболедували индивиди за период от 12 месеца:  
Изследване на антитела от клас IgG;  
Изследване на антитела от клас IgA;  
Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
3. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани и преболедували индивиди за период от 12 месеца:  
Изследване на антитела от клас IgG;  
Изследване на антитела от клас IgA;  
Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
4. Сравнение на получените резултати между преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани боледували
5. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани с бустерна доза за период от 3 месеца:  
Изследване на антитела от клас IgG;  
Изследване на антитела от клас IgA;  
Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
6. Сравнение между стойностите на IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела между ваксинирани за първите три месеца след завършване на вакцинационния курс и след поставяне на бустерна доза
7. Проследяване концентрациите на антителата за период от 3 месеца при преболедували индивиди, които преди това са ваксинирани

8. Анализ на значението на различни фактори като възраст, пол, тежест на протичане на заболяването и постваксинални реакции върху хуморалия имунен отговор

### **3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **3.1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ**

В хода на проучването са изследвани антитела от клас IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела (VNAб) от общо 175 човека за период от една година. Доброволците са на възраст 20-72 г. и са здравни работници в УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. От тях 103 индивиди са преболедували COVID-19, с различен момент на заразяване, като инфекцията е установена чрез RT-PCR или бърз антигенен тест. В последствие 32 от тях са били ваксинирани и са измерени антителата след завършване на ваксинационния курс. При останалите 72 работници няма данни за боледуване, а измерванията са направени след завършен курс на ваксинация. От тях, в периода на проследяване, са измерени антитела на 11 човека, след поставяне на бустерна доза и 9, при които е настъпила инфекция от SARS-CoV-2, като изследването е направено в различни месеци след бустерната доза или след боледуването. В таблица 1 са посочени броя на пробите във всяка група пациенти. В таблица 2 и таблица 3 е показано разпределението на пациентите съответно по възраст и по пол. Необходимата информация беше събрана посредством наличната медицинска документация и въпросник, попълнен лично от всеки пациент. Бяха подготвени три въпросника: за преболедували, за ваксинирани и за преболедували и ваксинирани. Преболедувалите бяха попитани за периода на инфекция, начина на установяването ѝ, симптоми и тяхната продължителност.

Ваксинираните бяха попитани за вида на продукта, който е поставен, наличие на реакции след всяка от дозите, както и тяхната продължителност. Въпросникът за преболедували и ваксинирани включваше същите въпроси и за двете събития. Всички пациенти бяха попитани за възраст, наличие на придружаващи заболявания и всекидневен прием на лекарствени средства. Специално внимание бе обърнато на продължителен прием на кортикостероиди или провеждане на биологична терапия по повод на хронично заболяване. В хода на събиране на доброволци не се откриха такива, които да отговарят на това условие. Участниците подписаха

информирано съгласие, с което разрешават използването на данните и декларират, че доброволно се съгласяват на пробовземането и използването на периферна венозна кръв.

*Таблица 1: Брой пациенти и брой проби, изследвани в обособените в това проучване групи*

Група	Брой пациенти	Брой проби
Преболедували	103	214
Ваксинирани	72	161
Преболедували и ваксинирани	32	60
Ваксинирани с бустерна доза	11	15
Ваксинирани и преболедували	9	9

Изследванията са извършени от периферна венозна кръв, взета по метода на стерилна венепункция във вакуумни епруветки Vacuette 5ml - серумни епруветки с Clot activator Непосредствено след пробовземането серумът беше отделян чрез центрофугиране и използван веднага. Когато изследването не можеше да се направи в същия ден, серумът се съхраняваше при температура -20°C.

Поради ретроспективния характер на проучването и хетерогенността в моментите на изследване бяха обособени следните периоди и групи пациенти. Данните за стойностите на антителата са разделени в 3 периода: **период I** включва измервания, направени между 1-ви и 3-ти месец след началото на инфекцията или след завършване на ваксинационния курс; **период II** е от 4-ти до 7-ми месец, а **период III** – от 8 до 12 месец след съответното събитие. Бяха обособени три групи от индивиди, при които антителата са изследвани спрямо тези три периода: преболедували, ваксинирани с две дози, при които няма данни за предишно боледуване и ваксинирани на фона на предишно боледуване. Освен това са налице още две групи: ваксинирани с бустерна доза и ваксинирани и след това боледували, при които антителата са проследени до 4-тия месец след бустера или началото на инфекцията.

Таблица 2: Разпределение на пациентите по възраст

Група	Общ брой пациенти	Възраст		
		20г.-40 г.	41г.-60 г.	>60г.
Преболедували	103	38	51	14
Ваксинирани	72	19	40	13
Преболедували и ваксинирани	32	10	19	3
Ваксинирани с бустерна доза	11	3	8	0
Ваксинирани и преболедували	9	2	6	1

Таблица 3: Разпределение на пациентите по пол

Група	Общ брой пациенти	Мъже	Жени
Преболедували	103	30	73
Ваксинирани	72	19	53
Преболедували и ваксинирани	32	9	23
Ваксинирани с бустерна доза	11	5	6
Ваксинирани и преболедували	9	2	7

С цел оценка на динамиката, в статистическите анализи бяха включени само участници с проведено изследване в поне два от

трите обособени периода. В групата на преболели средните стойности бяха определени при 46 участници. В групата на ваксинирани и неболели бяха включени 46 участници, като при всички е поставена иРНК ваксина. В групата на ваксинирани и болели бяха включени 14 участника, като отново при всички е приложена иРНК ваксина, като периодът между началото на инфекцията и поставянето на първа доза от ваксината е 6-8 месеца. При 11 участници са проследени антителата за 3 месеца след поставяне на бустерна доза. Хетероложна ваксинация не се наблюдава при нито един от участниците. При други 9 лица са проследени антителата до 4 месеца след „пробивна инфекция“.

Проучването е проведено при здравни работници, които, поради естеството на тяхната работа, са били тествани редовно за инфекция със SARS-CoV-2 чрез RT-PCR или бързи антигенни тестове. От проучването са изключени индивиди, при които, в хода на проследяването, е установена реинфекция или пробивна инфекция, или тяхното проследяване е продължило в някоя от другите обособени групи. Освен, че са били редовно тествани за инфекция, при ваксинираните серонаивни е проведено серологично изследване за установяване на антитела към SARS-CoV-2 преди поставянето на първата доза.

### 3.2. МЕТОДИ

**3.2.1. Изследване на антитела от клас IgG чрез Enzyme linked fluorescent assay (ELFA)** - За целта е използвана автоматизирана система VIDAS® SARS-COV-2 IgG/IgM(9COG/9COM) BIOMÉRIEUX, Франция. Автоматизацията на метода намалява риска от допускане на грешки при изпълнение на стъпките. Принципът на теста комбинира двустъпков “сандвич” ензимен метод с финална флуоресцентна детекция. Тест-китът съдържа готови за използване 9COG стрипове, които имат 10 сектора със следното съдържание:

Сектор	Реагенти
1	В нея се поставя 100µl от пробата или контролата
2	Буфер за разреждане на пробата
3-4-5	Промивен буфер
6	Моноклонални античовешки IgG, маркирани с алкална фосфатаза
7-8	Промивен буфер
9	Тази ямка е празна
10	Субстрат - 4-methyl-umbelliferyl phosphate

В тест-китът са включени също наконечници – Solid Phase Receptacles (SPR) 9COG, Стандарт S1 (9COG), положителна контрола и отрицателна контрола (C2). Solid Phase Receptacles служат като твърда фаза и пипетиращо устройство. Вътрешната им повърхност е покрита с рекомбинантен SARS-CoV-2 антиген (RBD на Spike - протеина). Стандарт S1(9COG) и Положителна контрола (C1)– съдържат рекомбинантни човешки IgG към SARS-CoV-2. При започване на употреба на нов тест – кит и на всеки 28 дни апаратът се калибровва като се определя два пъти стойността на S1 и по един път за положителната и отрицателната контрола.

Преди започване на работа пробите и съдържанието на кита се темперират за 30 минути на стайна температура. Стриповете и връхчетата се зареждат в съответните позиции на апарата. Към всеки стрип се добавя 100µl от предварително отделения серум. Изчаква се 10 минути след накапване на пробата в стрипа и се стартира програмата според инструкциите на апарата.

Всички стъпки се извършват автоматично от апарата.

При първата реакционна стъпка SARS-CoV-2 IgG се улавят от рекомбинантния SARS-CoV-2 антиген, покриващ вътрешната част на SPR – връхчетата. Несвързаните компоненти се премахват чрез отмиване. При втората реакционна стъпка IgG антителата се разпознават специфично от анти-човешки IgG, маркирани чрез алкална фосфатаза. Несвързаните компоненти се премахват чрез отмиване. При последната фаза субстратът (4-methyl-umbelliferyl phosphate) циркулира навън и навътре през SPR - устройството. Конюгантният ензим катализира хидролизата му във флуоресцентен продукт (4-methyl-umbelliferone), чиято флуоресценция се измерва при дължина на вълната 450 nm.

Резултатите се изчисляват автоматично от апарата. Флуоресценцията се измерва два пъти. Първото измерване (background) се прави на субстратната кювета преди взаимодействието на субстрата със SPR – устройството. Второто измерване е след взаимодействие на субстрата с ензима и образуване на флуоресцентния продукт. Относителната флуоресцентна стойност (RFV) се определя чрез изваждане на background стойността. Крайния резултат се определя по следната формула:

$$\frac{\text{patient RFV}}{\text{standart RFV}} = \text{Test value}$$

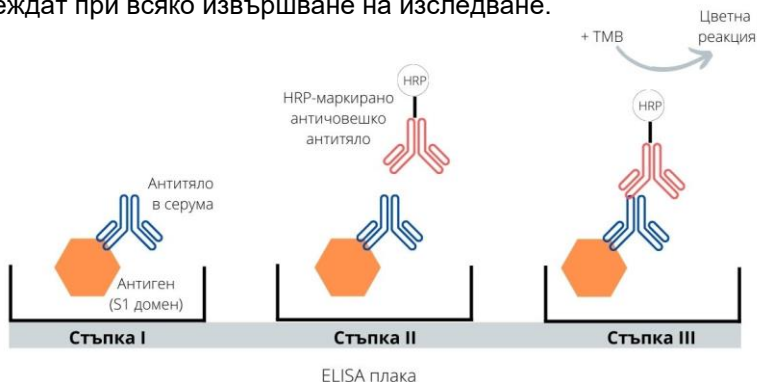
Получен резултат	Интерпретация
TV < 1.00	Отрицателен резултат – не са налични IgG антитела срещу SARS-CoV-2
TV ≥ 1.00	Положителен резултат – налични антитела срещу SARS-CoV-2

Според инструкциите на производителя получената стойност може да бъде изчислена в BAU/ml по следната формула, където  $k$  е предварително зададен коефициент равен на 20.33:

$$BAU/ml = k \cdot TV$$

**Ограничения на метода:** Провеждане на изследването в твърде ранен период от началото на инфекцията и наличие на антитела в серума към някои от компонентите на реагентите

**3.2.2. Изследване на антитела от клас IgA по Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** - Използван е ELISA тест за IgA антитела към SARS-CoV-2 на EUROIMMUN. Принципът на изследването се основава на двустъпковия сандвичев метод. Използват се ямки натоварени с антиген – S1 домена на Spike – протеина на SARS-CoV-2, експресиран чрез рекомбинация в човешка клетъчна линия HEK 293. В първата реакционна стъпка пробите от пациентите се инкубират в ямките, при което ако са налични IgA, те се свързват с антигена. При втората реакция се извършва инкубация с ензимно-маркирано античовешко IgA (фигура 1). Използва се ензимен конюгат, маркиран чрез пероксидаза, който катализира цветна реакция. В кита са предоставени също положителна и отрицателна контрола и калибратор, които се зареждат при всяко извършване на изследване.



Фигура 1. Принцип на ELISA метода за детекция на anti-S IgA

Методът се изпълнява по следния начин: Пробите и реагентите се темперират на стайна температура (18°C -25°C) за 30 минути. След това пробите се разреждат в Епендорф епруветки в съотношение 1:101 – 10 µl серум + 1000 µl Sample buffer. Приготвя се разтвор за промиване от промивен буфер концентрат и дестилирана вода в съотношение 1:10. Пробите с буфера се вортексират. В съответните ямки на плаката се накапват по 100 µl от разредените проби и от готовите за употреба контроли и калибратор. Плаката се покрива със защитно фолио и се инкубира за 60 минути в термостат на температура 37°C. Ямките се промиват с 300 µl разтвор за промиване 3 пъти, като на всеки промивен цикъл се изчаква 30 – 60 секунди. Добавя се по 100 µl ензимен античовешки IgA конюгат. Инкубира се 30 минути в термостат на температура 37°C. Ямките се промиват отново с 300 µl разтвор за промиване 3 пъти, като на всеки промивен цикъл се изчаква 30 – 60 секунди. Добавя се по 100 µl хромоген/субстратен разтвор – TMB (тетраметилбензидин), който води до развитие на синьо-оцветен комплекс с конюгата. Инкубира се 30 минути на стайна температура в пространство, защитено от пряка слънчева светлина. Реакцията се стопира чрез накапване във всяка ямка по 100 µl стоп-разтвор (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), което води до жълто оцветяване на крайния продукт. Плаката леко се разклаща за осигуряване на хомогенно разпределение на разтвора. Абсорбцията се отчита веднага чрез ELISA reader при дължина на вълната 450 nm.

Резултатите се анализират по следния начин: Първо се определя валидността на теста чрез отчитане Optical density (OD) на калибратора и контролите. Резултатът е валиден при определени стойности, предоставени от производителя. Следва изчисляване на резултата по следната формула:

$$\frac{OD \text{ проба/контрола}}{cut-off} = Ratio$$

Където:

*OD (optical density) value* – измерената абсорбция на пробата или контролата; *Cut-off value* – измерената абсорбция на калибратора при дължина на вълната 450nm. Резултатът се интерпретира по следния начин: Ratio < 0.8 – Отрицателен резултат; 0.8 ≤ Ratio < 1.1 – Гранична стойност и Ratio ≥ 1.1 - Положителен резултат.

Методът има следните ограничения: Първото ограничение е провеждане на изследването в ранен етап на инфекцията. Температурата на помещението също може да окаже влияние върху крайния резултат, защото свързващата активност на антителата и активността на използваните ензими са температурно – зависими. Грешка може да се получи при неспазване на пипетиращите обеми и времето за инкубация, при недостатъчното промиване или при наличие на остатъчна течност в ямките.

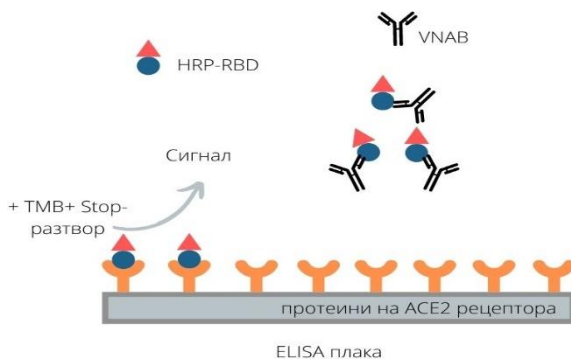
### **3.2.3 Изследване на вируснеутрализиращи антитела (VNA<sub>b</sub>)**

За целта се използва Surrogate virus neutralization test (sVNT) произведен от GenScript, Китай. Тестът се извършва по подобен на ELISA метод и дава количествено определение на процента на вируснеутрализираща активност. Имитира се *in vitro* взаимодействието между вирус и гостоприемник. За целта се използват два ключови компонента: фрагмент от пречистен белтък – рецептор-свързващия домен (RBD) на Spike протеина, който е маркиран с пероксидаза (HRP-RBD) и човешки ACE2 рецепторен протеин (hACE2). Тестът отчита блокирането на реакцията от наличните в серума вируснеутрализиращи антитела (фигура 2).

Използван е кръвен серум от пациентите като изследването се започваше веднага след пробовземането. При невъзможност това да се случи, пробите бяха съхранявани във фризер при температура -20°C, съгласно инструкциите на производителя.

Методът се изпълнява по следния начин: Пробите и работните китове се темперират на стайна температура (18°C -25°C) за около 30 мин. След това се вортексират пробите и контролите. Приготвят се разреждания по следните стъпки: В Епендорф епруветка се прави разреждане - HRP-RBD : Буфер за разреждане на HRP-RBD в съотношение 1:1000. В други Епендорф епруветки, обозначени с номера на пробата се прави разреждане на пробата/контролата с буфер за разреждане на проби/контроли в съотношение 1:9 (За пробите от пациентите – 10 µl серум и 90 µl буфер, а за контролите – 7 µl контрола и 63 µl буфер). Приготвя се разреден разтвор за промиване от разтвор за промиване и дестилирана вода в съотношение 1:19 (в зависимост от броя на ямките, които ще бъдат използвани, обикновено 1ml (2 ml) разтвор за промиване и 19 ml (38ml) вода ). В отделни Епендорф епруветки, обозначени с номера на пробата се смесват разредените проби или контроли с разреждения HRP-RBD в съотношение 1:1 (60 µl проба/контрола и 60 µl разреден HRP-RBD) и се инкубират в термостат при температура

37°C за 30 минути. На тази стъпка се осъществява свързване на циркулиращите неутрализиращи антитела с RBD – домена на Spike – протеина, маркиран с пероксидаза. След това по 100 µl от инкубираната смес от се налива в ямките на плаката, предварително наточени с hACE2 белтък. Инкубира се в термостат на 37°C за 15 минути. При тази инкубация несвързаните с антитела молекули на HRP-RBD и свързаните с антитела, които не са неутрализиращи, полегват по плаката, докато комплексите HRP-RBD и вируснеутрализиращи антитела остават в супернатанта, който след това се промива. Във всяка ямка се налива по 100 µl TMB разтвор и се инкубира на стайна температура, в пространство, защитено от слънчева светлина за 15 минути. Получава се синьо оцветяване с различен интензитет. Добавя се по 50 µl стоп-разтвор, което води до жълто оцветяване на крайния продукт. Определя се абсорбцията чрез ELISA ридър при дължина на вълната 450nm.



**Фигура 2. Схематично представяне на реакцията за определяне на вируснеутрализиращи антитела (VNAb)**

Резултатите се анализират по следния начин: Първо изследването се валидира чрез отчитане стойностите на положителната и отрицателната контрола. Измерената оптична плътност трябва да отговаря на съответните параметри, предоставени от фирмата-производител. Средната оптична плътност (OD) на отрицателната контрола служи освен за потвърждаване валидността на резултатите, а така също за изчисляване процента на инхибиране по следната формула:

$$\left( 1 - \frac{OD \text{ на проба или контрола}}{OD \text{ отрицателна контрола}} \right) \times 100 = \% \text{ Inhibition}$$

Cut-off	Резултат	Интерпретация
$I \geq 30 \%$	Положителен	Наличие на неутрализиращи антитела към SARS-CoV-2
$I < 30 \%$	Отрицателен	Липса или ниво под границата на откриване на неутрализиращи антитела към SARS-CoV-2

Методът има следните ограничения: Провеждане на изследването в ранен период от развитието на инфекцията; Твърде висока или твърде ниска температура на помещението; Контаминация на субстрата; неспазване на пипетиращите обеми и времето за инкубация между отделните стъпки; нарушаване целостта на ямките; неспазване на процедурата по промиване на ямките

**3.2.4. Статистически анализ и обработка на данните** - За целите на статистическата обработка на данните е използван програмен език **Python 3.9** и следните библиотеки от него *Matplotlib* (за получаване на графиките), *NumPy*, *Pandas* (за обработка на данните и подготовката им преди статистическия анализ) и *SciPy* (за статистически анализ на данните). При проверката за статистически значима разлика между две популации беше избрано ниво на значимост, при което бихме могли да отхвърлим нулевата хипотеза -  **$p \leq 0.05$** . Беше извършен дескриптивен анализ на наличните данни за стойностите на антителата на отделните групи пациенти през отделните периоди и месеци. Използван е **Student's t-test** за сравняването на разпределенията на две популации от пациенти и за количествената оценка на **p-value**, а от там и оценка за наличието на статистически значима разлика между средните стойности на стойностите на антителата на отделните групи през отделните периоди и месеци. При получаване на стойност за **p-value** по-малка или равна на **0.05** бихме могли да отхвърлим нулевата хипотеза за избраното ниво на значимост ( **$H_0$ : Статистически значима разлика между средните стойности на броя на антителата за сравняваните групи не съществува**) като невярна с вероятност **> 95%** и бихме могли да приемем алтернативната хипотеза ( **$H_A$  : Статистически значима разлика между средните стойности на броя на антителата за сравняваните групи съществува**). За количествената оценка на корелационните зависимости между отделните параметри беше

използван корелационен коефициент на **Pearson (R)**. За качествено определяне на степента на корелация и нейното тълкуване беше използвана следната скала:  $R < 0.3$  – слаба корелация;  $0.3 < R < 0.5$  – умерена корелация;  $0.5 < R < 0.7$  – значителна корелация;  $0.7 < R < 0.9$  – висока корелация и  $0.9 < R < 1$  – много висока корелация. В дисертационния труд беше обърнато внимание и бяха коментирани двойките параметри, при които е налична умерена или по-голяма корелация ( $R \geq 0.3$ ). За проверка на достоверността на коефициента беше използвана стойност на  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

#### **4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ**

В настоящето проучване е проследен хуморалният имунен отговор към RBD-участъка на Spike – протеина, което за краткост в текста ще бъде обозначено като „хуморален имунен отговор“.

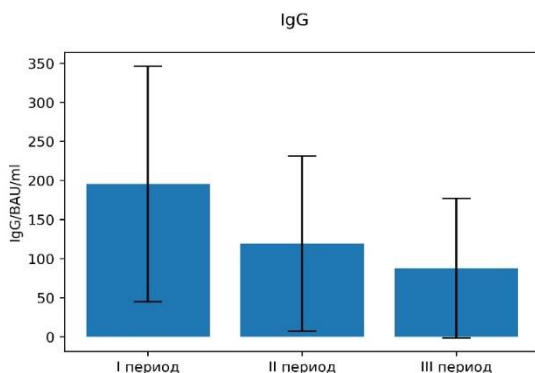
### **РАЗДЕЛ I. ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ПРИ ПРЕБОЛЕДУВАЛИ**

Измервания на антителата са направени при 103 здравни работници ( $n=103$ ), при които е установена SARS-CoV-2 инфекция чрез RT-PCR диагностика или бърз антигенен тест, извършен в лицензирана лаборатория. В статистиката относно динамиката на антителата по периоди са включени 46 индивиди ( $n=46$ ), за които са налични данни в поне два от трите периода. За 12 от тези 46 пациенти (12/46) е налична информацията относно стойността на антителата и в трите периода, при 15 (15/46) измерванията са направени в период I и II, 9 (9/46) са проследени в I и III и 10 (10/46) във II и III период.

#### **I.1. Антитела от клас IgG**

За отделните периоди са налични данни за IgG на следния брой индивиди: за период I – 36 човека ( $n=36$ ), за период II – 37 ( $n=37$ ) и за период III – 32 ( $n=32$ ). При някои от тях получената стойност е под  $\text{cut-off value}$  (20.33 BAU/ml) и тези индивиди не са представени в графиката, която проследява динамиката на средните стойности на антителата в отделните времена. От дадените 36 човека за период I при трима (3/36) са измерени отрицателни стойности, в период II при

трима от 37 (3/37) , а в трети период при 6 от 32 (6/32) резултатите са под граничната стойност. Средните стойности на IgG за трите периода са представени на фигура 3.



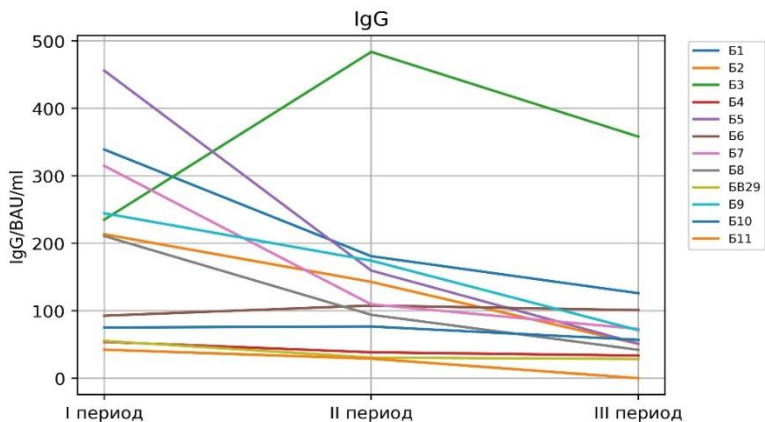
*Фигура 3. Средни стойности на IgG в период I, II и III при преболедували*

Стойностите на минимално измерената положителна стойност за IgG, максималните и средните стойности по периоди са представени в таблица 4.

*Таблица 4: Минимални, максимални и средни стойности на IgG, измерени при преболедували в трите периода*

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	20.33 BAU/ml	504.387 BAU/ml	195.6 BAU/ml
Период II	20.33 BAU/ml	483.854 BAU/ml	119.25 BAU/ml
Период III	20.33 BAU/ml	358.215 BAU/ml	89.35 BAU/ml

Динамиката на антителата от клас IgG при пациентите, при които е налично проследяване в трите периода (n=12), е представена на фигура 4.



Фигура 4. Динамика на антителата от клас IgG при пациентите с налично изследване и в трите периода

Само при един от пациентите се наблюдава отклонение от нормалния ход. Този пациенти е отбелязал в своя въпросник, че боледуването е продължило 2 – 4 седмици, следователно при него е вероятно изследването в период I да е направено преди достигане на пиковите стойности на IgG.

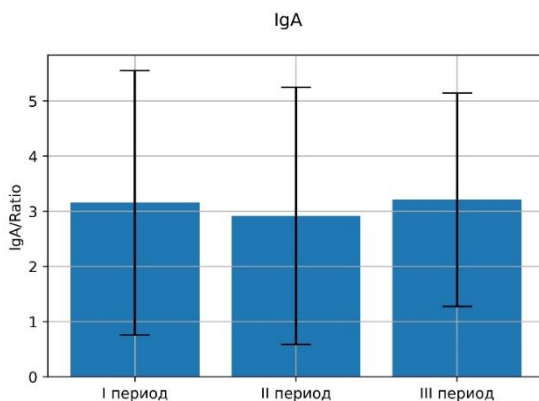
Статистическият анализ между отделните периоди показва следните зависимости.

No период vs No период	p - value
I vs II	0.018
II vs III	0.215

Спадът в средните стойности между трите периода е: 39.03% между период I и II, 26.26% между период II и III и 55.05% между период I и III. Т-статистиката показва статистически значима разлика в средните стойности между период I и II, но не и между период II и III.

## I.2. Антитела от клас IgA

При същата група от 46 преболедували здравни работници са изследвани и антитела от клас IgA като броят на измерванията е следния: за период I – на 20 човека, за период II – 27 и за период III – 24. При трима от 20-те пациенти в първия период (3/20) полученият резултат на ratio е по-малък от 0.8. Във втори период от 27 човека при 3-ма (3/27) измерената абсорбция показва антитела в интервала на граничната стойност, а при други 3-ма стойностите са били отрицателни. В период III трима от 24 пациенти (3/24) имат гранични резултати за IgA. На фигура 5 е представена средната стойност на динамиката на IgA антителата по периоди.

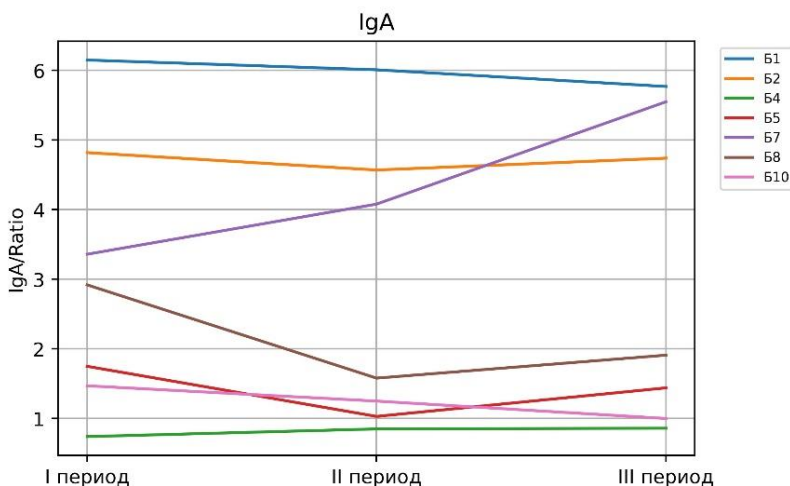


*Фигура 5: Средни стойности на IgA в период I, II и III при преболедували*

От графиката се вижда, че средните стойности на антителата от клас IgA се запазват почти непроменени. Същият резултат е получен и от Т-статистиката между периодите, при която не се открива статистически значима разлика. Въпреки че тенденция за понижаване не се наблюдава при сравняване на средните стойности, в период III броят на отрицателните резултати е по-голям, отколкото в предходните два. На таблица 5 са представени минималната положителна стойност, която е измерена, максималните и средните стойности по периоди. На фигура 6 е представено графично изображение на динамиката на IgA при 7 участници, при които е проведено изследване и в трите периода.

Таблица 5: Минимални, максимални и средни стойности на IgA, измерени при преболедали в трите периода

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	R = 1.10	R = 9.58	R = 3.15
Период II	R = 1.25	R = 9.59	R = 2.92
Период III	R = 1.20	R = 8.50	R = 3.21



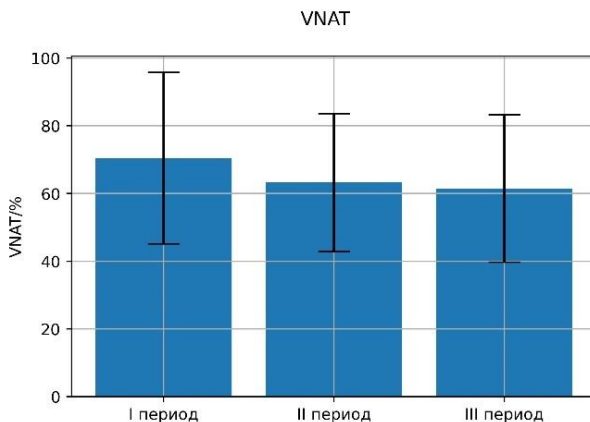
Фигура 6. Динамика на anti-S IgA при участници с налични изследвания и в трите периода

На фона на лек спад или относителна стабилност в серумните концентрации на IgA при един от пациентите се наблюдава значително покачване, като при него няма данни за тежко или продължително боледуване.

### I.3. Вируснеутрализиращи антитела

Изследван е вируснеутрализиращият потенциал на антителата на дадените 46 пациенти посредством Surrogate virus neutralizing test (sVNT), чрез който се определя процента на потискане на взаимодействието между RBD на S – протеина на SARS-CoV-2 и ACE2 – рецептора. Такова измерване не е направено при индивидите с отрицателна стойност на IgG. По периоди са направени следните измервания: за първи период при 20 човека

(n=20), за втори период – 27 (n=27) и за трети период – 24 (n=24). Всички изследвания са включени в графиката за динамика на средните стойности. Тук за отрицателен резултат се приема инхибиране ( $I \leq 30\%$ ). В период I недостатъчно потискане е измерено в 3 от серумите (3/20). Във втори период  $I \leq 30\%$  е получена при 2 пациенти (2/27). В период III при един (1/24) работник резултатът е отрицателен. На фигура 7 е представена динамиката в средните стойности на процента инхибиране.



*Фигура 7. Средни стойности на процента вируснеутрализиращи антитела за период I, II и III при преболедали*

На таблица 6 са представени минималните положителни резултати, максималните и средните стойности на вируснеутрализиращи антитела по периоди.

*Таблица 6: Минимални, максимални и средни стойности на VNAb, измерени при преболедали в трите периода*

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	$I = 32.3\%$	$I = 96.8\%$	$I = 70.45\%$
Период II	$I = 33.6\%$	$I = 97\%$	$I = 63.24\%$
Период III	$I = 32.7\%$	$I = 96.7\%$	$I = 61.44\%$

Забелязва се, че и в трите периода има индивиди с максимален процент вируснеутрализиращи антитела, т.е. до 1 година след боледуването при тях се запазва висок процент на инхибиране. Т – тестът не показва статистически значима разлика между средните стойности в отделните периоди. Изчислението на процента спад показва следните зависимости: между период I и II – 10.23%; между II и III – 2.81% и между I и III – 12.76%. По-бърз темп на спад се наблюдава през първите 7 месеца, което корелира и с данните за IgG, където се открива същата зависимост.

#### **I.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при преболедували**

Чрез определяне корелационния коефициент на Pearson (R) между стойностите на трите параметъра в период I и факторите, повлияващи хуморалния имунен отговор при преболедували бяха наблюдавани следните зависимости. Относно влиянието на възрастта, ние установихме умерена правопрпорционална връзка между стойностите на IgG и възрастта като  $R=0.39$ ,  $p=0.018$ . Корелационните зависимости по отношение на тежестта на протичане на заболяването при трите изследвани параметъра са показани в таблица 7.

*Таблица 7: Корелационни зависимости между стойностите на IgG, IgA, VNAб и начина на протичане на заболяването*

Параметър	Показател	Стойност на R	Стойност на p-value	Вид корелация
IgG	Усложнения от заболяването	0.33	0.05	Умерена
IgA	Усложнения от заболяването	0.36	0.012	Умерена
IgA	Продължителност на симптомите	0.51	0.022	Значителна
IgA	Хоспитализация	0.71	0.0004	Висока

Така изложените данни показват наличие на правопрпорционална зависимост между стойностите на IgG и IgA и тежестта на протичане на заболяването, като в най-висока степен такава е показана при антителата от клас IgA.

От началото на пандемията от SARS-CoV-2 започнаха редица проучвания относно динамиката и продължителността на естествено придобития хуморален имунитет. След като повечето от тях потвърдиха нормална за вирусна инфекция динамика по време на боледуване и в ранната реконвалесцентна фаза [Kellam et al. 2020; Lou et al. 2020; Ma et al. 2020], остана за изясняване продължителността на хуморалния имунитет и динамиката в дългосрочен план. Въпреки че са по-малко и броят на участниците в тях е ограничен, изследванията върху другите два вида коронавируси, които могат да протичат с тежка клинична картина (SARS-CoV и MERS-CoV), показват наличие на вируснеутрализираща активност дори след 2–3 години. В настоящето проучване е разгледан хуморалния имунитет срещу SARS-CoV-2 при участници, инфектирани в периода ноември 2020г. – декември 2021г., когато основни варианти на разпространение са били Alpha, Beta и Delta [Janik et al. 2021; Singh et al. 2021; Chen et al. 2022].

Ние установихме, че до 7 месеца от началото на инфекцията, около 92% от изследваните индивиди са положителни за IgG към S-протеина. Наблюдавахме също спад на антителата, като общия такъв между период I и III е 55.05% и е по-силно изразен в първите 7 месеца след боледуване и отслабва през следващите.

Данните, представени в нашето проучване относно процента на серопозитивност в период I (до 3 месеца от началото на инфекцията), корелират и с резултатите от други изследвания [Marot et al. 2021; Gudbjartsson et al. 2020]. В сравнение с нашата информация за хуморалния имунитет в период II (4-7 месеца от инфекцията) могат да се посочат няколко научни труда, при които получените резултати са близки до нашите [Liu et al. 2020; Chirathaworn et al. 2020]. Само в едно от проучванията, което обаче е с по-малък обхват от споменатите към момента (изследвани са 20 индивиди), се посочва по-бърз спад на IgG и серонегативност от 25% след 8 месеца от боледуването [Peng et al. 2021]. Съответно на нашата статистика, която показва 39.03% спад на антителата през първите 7 месеца, Gaebler и колектив съобщават за 32% понижаване на анти-RBD IgG при 87 изследвани в период 165-223 ден от началото на инфекцията [Gaebler et al. 2021]. Друго проучване посочва същата динамика при проследяване за период от 1 година и положителни стойности за IgG при 95% от изследваните [Petersen et al. 2021]. Спад от 35.7% за период от 9 месеца и 69.9% за 12 месеца се установява в изследване на 879 преболедували от Ухан,

Китай [Li et al. 2021]. Съответно на нашия резултат относно процента на сероположителни индивиди след 8-12 месеца в проучване върху 132 здравни работници се установява 79% серопозитивност за IgG след 1 година от началото на инфекцията [Glück et al. 2022].

В нашето проучване беше направен статистически анализ между стойностите на антителата в първи период, възрастта и начина на протичане на заболяването. Открихме умерена корелация ( $0.3 < R < 0.5$ ) между наличието на усложнения и стойностите на IgG. Въпреки че усложнения се констатират дори и при по-леки форми на инфекцията, измерената от нас корелация е в съответствие с редица други проучвания, които посочват положителна връзка между първоначалния хуморален имунен отговор и тежестта на заболяването. По-голяма разлика се наблюдава между асимптоматичните и симптоматичните пациенти като при наблюдение на 74 индивиди (по 37 във всяка група) след 2 месеца 40% от асимптоматичните са серонегативни, сравнено с 12.9% от проявилите симптоми [Long et al. 2020].

Относно влиянието на възрастта като фактор на хуморалния имунен отговор ние открихме умерена корелация между възраст и стойности на IgG в първи период. Такава зависимост се посочва и в други изследвания, които показват положителна връзка в ранния реконвалесцентен период, но след това не се установява значима разлика [Wang et al. 2020; Li et al. 2021].

Данните от нашето проследяване на стойностите на анти-S IgA показаха почти еднакъв процент на положителните индивиди за трите периода: съответно 85%, 88.8% и 87.5%. Освен това не се наблюдават значими разлики в максималните и средните стойности до 1 година след боледуване. Докато повечето проучвания показват сходна динамика в IgA по време на инфекция и в ранния реконвалесцентен период, резултатите от по-продължителните проследявания са противоречиви. Някои от проучванията показват бърз спад на IgA, наблюдаван още в първите 3 месеца от началото на инфекцията. В едно от тях се посочва понижаване броя на положителните за анти-S IgA от 88.5 в месец 2 до 80.5% в месец 3 [Marot et al. 2021]. По-усилен спад в сравнение с IgG и 19% положителни индивиди след 12 месеца посочват Glück и колектив в тяхното обсервационно изследване [Glück et al. 2022]. Въпреки че тези данни съвпадат с изученото до момента относно кинетиката на антителата по време и след повечето вирусни инфекции, резултатите от няколко други проучвания корелират с наблюдаваната и от нас стабилност в нивата на IgA към SARS-CoV-2 [Chirathaworn et al. 2020]. Понижаване с 15% през първите 6 месеца

и средни стойности на Ratio от 3 за същия период се посочват от някои автори, които предполагат, че при някои преболедали пациенти водещи в хуморалния имунитет са антителата от клас IgA [Gaebler et al. 2021; Ivanov et al. 2021]. Нашият статистически анализ показва умерена положителна корелация между стойностите на IgA и наличието на усложнения и по-високи нива на IgA при хоспитализираните участници. Получената от нас зависимост е в съответствие и с резултатите от други проучвания [Gudbjartsson et al. 2020; Röltgen et al. 2020; Bruni et al. 2020].

Стабилност във вируснеутрализиращия потенциал до 1 година от боледуване констатирахме в нашето изследване, което съвпада и с изложените резултати за IgG и IgA. Процентът на положителните за вируснеутрализиращи антитела пациенти се запази сравнително еднакъв през целия период на проследяване.

Нашите резултати се подкрепят и от други автори, които посочват стабилни нива на вируснеутрализиращите антитела и спад предимно в първите месеци [Rockstroh et al. 2021; Wajnberg et al. 2020]. Публикувани са обаче и няколко изследвания, при които данните показват по-малък процент на положителни за VNAb индивиди след 3-тия месец. [Wang et al. 2021; Wu et al. 2021]. Въпреки по-големия спад, в тези проучвания също се показва висока вируснеутрализираща активност.

След като показахме връзка между тежестта на протичане на заболяването и нивата на IgG и IgA, съпоставяйки няколко показателя, следва да отбележим, че за процента вируснеутрализираща активност не открихме такава корелация. В няколко от проучванията е посочена връзка между тежестта на клиничната картина и ранния вируснеутрализиращ отговор. Не се откриват обаче данни за по-високи стойности при по-тежко боледуване след третия месец от началото на инфекцията. За това изравняване допринася и по-големия спад, наблюдаван при пациенти, при които пиковите стойности са били по-високи [Lyer et al. 2020; Röltgen et al. 2020; Rockstroh et al. 2021; Robbiani et al. 2020; Crawford et al. 2021].

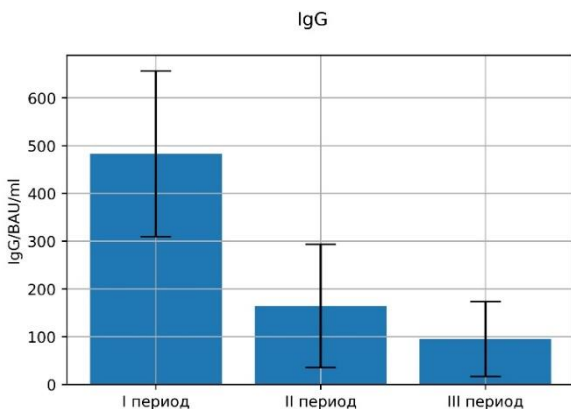
## РАЗДЕЛ II. ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ПРИ ВАКСИНИРАНИ

### II.1. Хуморален имунитет при завършване на ваксинационния курс

При 72 здравни работници са изследвани антитела след завършване на ваксинационния цикъл, съгласно упътванията на производителя. Измерванията са направени отново в три периода, както при преболедувалите. В статистиката относно динамиката на антителата по периоди са включени общо 46 индивиди ( $n=46$ ), при които има изследване в поне два от трите периода. За 15 от тях са налични данни и за трите периода ( $15/46$ ), при 18 ( $18/46$ ) измерванията са направени в първи и втори период и при 13 ( $13/46$ ) са в първи и трети период. Няма лица с данни за втори и трети период и при всички 46 участника са налични измервания в период I.

#### II.1.1. Антитела от клас IgG

При всички 46 ваксинирани здравни работници са измерени антитела от клас IgG в период I и при 100% от тях се наблюдава имунен отговор. Във втори период са направени измервания на 33 – ма човека като отново всички резултати са положителни. За период III изследване е проведено при 30 участника, като при 1 от тях ( $1/30$ ) стойността е била под Cut-off value. На фигура 8 е представена динамиката на средните стойности на IgG по периоди.



Фигура 8. Средни стойности на антителата от клас IgG при ваксинирани неболедували в период I, II и III.

Минималните положителни резултати, максималните и средните стойности са представени на таблица 8. Резултатите от проведените статистически тестове между трите периода са представени в таблица 9.

*Таблица 8: Минимални, максимални и средни стойности на IgG, измерени при ваксинирани серонаивни в трите периода*

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	105.106 BAU/ml	784.535 BAU/ml	482.92 BAU/ml
Период II	30.495 BAU/ml	507.03 BAU/ml	164.2 BAU/ml
Период III	21.753 BAU/ml	315.115 BAU/ml	95.21 BAU/ml

*Таблица 9: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgG в трите периода, изразени чрез p-value и процент на спад*

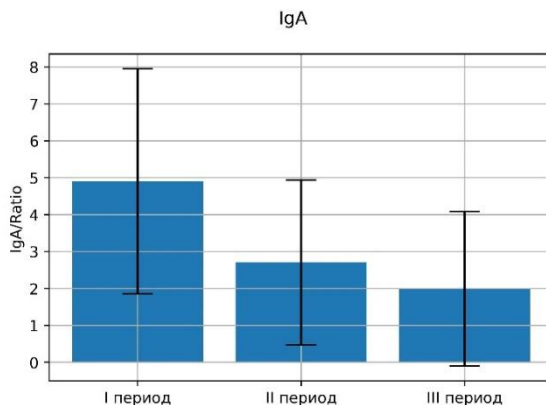
Но период vs No период	p-value	Спадане в %
I vs II	0.0001	66
II vs III	0.018	42.02
I vs III		80.28

При провеждане на T-статистика се открива статистически значима разлика между период I и II и между период II и III. Освен това се наблюдава значителен процент на спад в средните стойности на антителата, по-силно изразен в първите 7 месеца от завършването на ваксинационния курс. Спадът е отразен и в максимално измерените стойности, като за всеки период намалява с около 200 BAU/ml.

## **II.1.2. Антитела от клас IgA**

Антитела от клас IgA за първи период са изследвани при 27 човека. Отрицателен резултат е получен при 1 (1/27), а при други двама участници (2/27) стойността на ratio попада в граничния интервал. За период II са налични данни относно 29 участници. При 7 от тях (7/29) стойностите са отрицателни, а при други 4-ма участници (4/29) ratio е в граничния интервал. В третия период са изследвани антитела от този клас при 22-ма индивиди. При 5 от тях

резултатът е отрицателен, а при други 3-ма стойността е в граничния интервал. Динамиката на средните стойности на IgA е представена на фигура 9. Минималните положителни, максималните и средните стойности са представени в таблица 10. На таблица 11 са представени данните от статистическия анализ между отделните периоди.



Фигура 9. Средни стойности на антителата от клас IgA при ваксинирани неболедували в период I, II и III.

Таблица 10: Минимални, максимални и средни стойности на IgA, измерени при ваксинирани серонаивни в трите периода:

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	R = 1.38	R = 10.53	R = 4.91
Период II	R = 1.14	R = 9.56	R = 2.71
Период III	R = 1.1	R = 9.8	R = 1.99

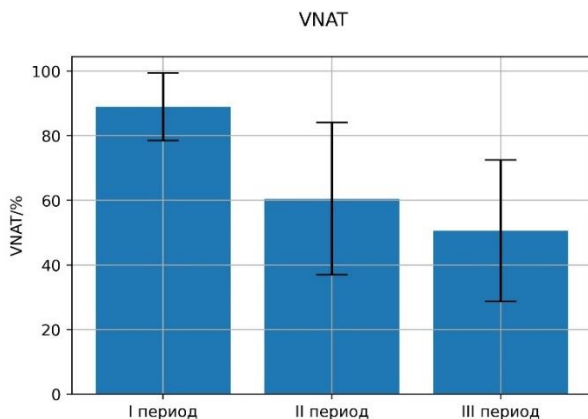
Статистически значима разлика се наблюдава само между първи и втори период и отново в първите 7 месеца темпът на спад е по – силно изразен отколкото в следващите пет. Въпреки това и в трите периода се откриват индивиди с високи стойности на IgA, което означава, че при някои от тях спад не се наблюдава.

Таблица 11: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgA в трите периода, изразени чрез p-value и процент на спад:

Но период vs No период	p-value	Спадане в %
I vs II	0.004	44.81
II vs III	0.257	26.57
I vs III		59.47

### II.1.3. Вируснеутрализиращи антитела

Потенциалът на инхибиране на взаимодействието между RBD участъка на Spike – протеина на SARS-CoV-2 и ACE2-рецептора е определен както следва. За период I при 31 индивиди, като при всички резултатите са положителни, в период II при 29 участници, като при трима от тях инхибирането е под 30%, т.е. резултатът е отрицателен и при 27 човека в трети период, като при 6 от тях  $I < 30\%$ . На фона на изложената към момента динамика при IgA и IgG се наблюдава следния темп на вируснеутрализиращия потенциал, представен на фигура 10.



Фигура 10. Средни стойности на процента вирусна неутрализация при ваксинирани неболедували в период I, II и III.

В период I максимално измерената стойност е 97.8%, а минималната е 58.2%. Максималният и минималният положителен резултат за период II са съответно: 98% и 36.8%, а за период III както следва: 94.5% и 35.1%. Както се вижда и в трите периода има пациенти с високи стойности на вируснеутрализиращия потенциал, като с времето броят на отрицателните резултати се увеличава. Относително висок е и минималният потенциал в период I. Средните стойности за трите периода са: 89.03%, 60.49% и 50.6%. Статистическия анализ между трите периода е представен на таблица 12.

*Таблица 12: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgA в трите периода, изразени чрез p-value и процент на спад:*

<b>No период vs No период</b>	<b>p-value</b>	<b>Спадане в %</b>
I vs II	0.0001	32.06
II vs III	0.116	16.35
I vs III		43.17

Открива се статистически значима разлика за VNAb между период I и период II, но такава не се открива между II и III период. Това се вижда и при изчисление процента на спад, което корелира и с данните за IgG и IgA.

#### **II.1.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при ваксинирани серонаивни**

В настоящето проучване бяха изследвани корелационни зависимости между стойностите на трите параметъра в период I с възрастта на участниците и със съобщените от тях постваксинални реакции. Ние не установихме сигнификантна зависимост ( $R \geq 0.3$ ,  $p \leq 0.05$ ) между резултатите в период I и възрастта на участниците. При сравнение стойностите на антителата със съобщените от пациентите постваксинални реакции и тяхната продължителност, също не установихме сигнификантна зависимост. При определяне коефициента на корелация между стойностите на трите отделни параметъра в период I наблюдавахме умерена корелация ( $R=0.47$ ,  $p=0.002$ ) между стойностите на IgG и IgA и значителна корелация ( $R=0.64$ ,  $p=0.012$ ) между тези на IgG и VNAb.

## II.2. Хуморален имунитет при ваксинирани с бустерна доза

В хода на изследването от 72-ма ваксинирани работници, при 11 са проследени антителата след поставяне на бустерна доза, като периодът на проследяване е 3 месеца. Броят на изследваните пациенти по месеци е както следва: месец 1 – 5 (n=5), месец 2 – 3 (n=3), месец 3 – 6 (n=6). Прилагането на бустерна доза е осъществено между 5 – 11 месец от завършване на вакцинационния курс.

### II.2.1. Антитела от клас IgG

При всички пациенти са изследвани антитела от клас IgG, като отрицателни стойности не са измерени за нито един от месеците. Максималните, минималните и средните стойности за отделните месеци са представени на таблица 13.

*Таблица 13: Минимални, максимални и средни стойности на IgG, измерени при ваксинирани с бустерна доза за първите три месеца след вакцинация*

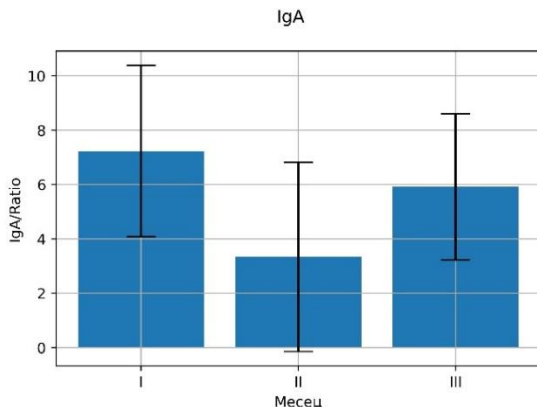
Месец	Минимална стойност/ BAU/ml	Максимална стойност/ BAU/ml	Средна стойност/ BAU/ml
Месец 1	419.001	776.403	649.71
Месец 2	384.237	784.941	627.52
Месец 3	289.5	669.264	508.42

От представените средни стойности за IgG не се наблюдава значително намаляване на стойностите за първите 3 месеца. От статистическия анализ също не се установява значителна разлика между първите три месеца. Процентът на спад между месец 1 и 3 е 21.75%.

### II.2.2. Антитела от клас IgA

Антитела от клас IgA са изследвани при всички пациенти с изключение на един в месец 2. Отново се наблюдават предимно положителни стойности, като само при един от участниците в месец 2 Ratio е отрицателно. При него обаче се установява висока стойност на IgG – 713.38 BAU/ml. Максимално измерената стойност на IgA за целия период на проследяване е 10.35 (R=10.35) и е измерена в

месец 1. В месец 3 максимално измереният резултат за IgA е 10 (R=10). Динамиката в средните стойности на IgA за трите месеца е представена на фигура 11.

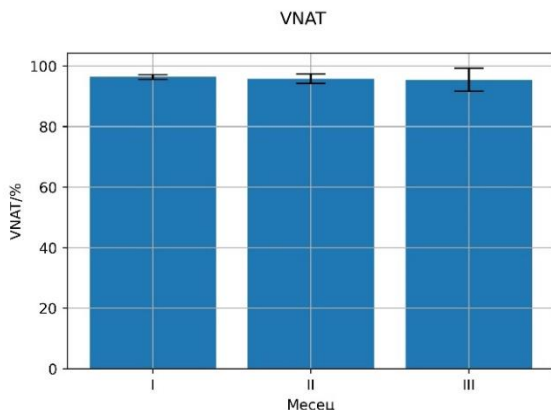


*Фигура 11. Средни стойности на IgA през месец 1, 2 и 3 след поставяне на бустерна доза*

Поради недостатъчния брой изследвания ( $n=3$  за месец 2) не може да се даде заключение относно динамиката на антителата, но със сигурност след достигане на пикови стойности в месец 1, през следващите месеци се наблюдава понижаване. Оценката на статистически значима разлика също би била недостатъчно категорична. Спадът на IgA между месец 1 и 3 е 18.12%.

### **II.2.3. Вируснеутрализиращи антитела**

Процентът вирусна инхибция е изчислен при всички с изключение на един участник в месец 2 (фигура 12). Минимално измерената стойност за целия период на проследяване е 88% в месец 3. От графиката се вижда липсата на промяна в средните стойности на процента вируснеутрализиращ потенциал.



Фигура 12. Средни стойности на процента вирусна инхибиция в месец 1, 2 и 3 след поставяне на бустерна доза

### II.3. Сравнение на хуморалния отговор между ваксинирани със завършен ваксинационен курс и поставилите бустерна доза

#### II.3.1. Антитела от клас IgG

Проведохме статистически анализ за стойностите на IgG между първите три месеца след завършване на ваксинационния курс и след поставяне на бустерна доза. Данните за средните стойности (в BAU/ml) при двете групи са представени на таблица 14.

Таблица 14: Средни стойности на IgG в първите три месеца след завършване на ваксинационния курс и след поставяне на бустерна доза

	Месец 1	Месец 2	Месец 3
След завършване на ваксинационния курс	509.478	396.917	386.726
След поставяне на бустерна доза	649.71	627.52	508.42

Наблюдава се тенденция за по-усилен спад на антителата през първите три месеца в групата на ваксинирани с две дози, докато средните стойности при поставяне на бустерна доза се запазват почти непроменени през периода на проследяване. Статистически значима разлика се установява само в месец 2 ( $p=0.0002$ ), докато в месец 3 такава не се установява. Следва обаче да се отбележи

голямата разлика в броя на включените пациенти в двете групи, поради което не може да се направи окончателно заключение.

### II.3.2. Антитела от клас IgA

Информацията за средните стойности на ratio за IgA през първите три месеца при двете групи участници е представена на таблица 15. При статистическия анализ не се открива значима разлика между отделните месеци. Наблюдават се обаче по-високи средни стойности след прилагане на бустерна доза в месец 1 и месец 3. За месец 2 обаче разполагаме само с две изследвания, като при едното резултатът е отрицателен ( $R = 0.55$ ), а при другото  $R = 8.24$ . Отново поради по-малкия брой изследвания в групата на ваксинираните с бустерна доза не може да се направи окончателно заключение за това дали при поставянето на бустерна доза концентрациите на IgA са по-високи.

*Таблица 15: Средни стойности на IgA в първите три месеца след завършване на ваксинационния курс и след поставяне на бустерна доза*

	Месец 1	Месец 2	Месец 3
След завършване на ваксинационния курс	5.74	3.99	3.07
След поставяне на бустерна доза	7.23	3.33	5.29

### II.3.3. Вируснеутрализиращи антитела

Вируснеутрализиращият потенциал (в %) на антителата след поставяне на втората доза и след бустер през първите три месеца са представени на таблица 16. Наблюдават се малко по-високи средни стойности след поставяне на бустерната доза, но при статистическия анализ не се открива значима разлика в нито един от месеците. Въпреки наблюдавания спад при IgG и IgA, процентът на инхибиране на взаимодействието между RBD на Spike-протеина и ACE2 рецептора се запазва висок и в двете групи през първите три месеца.

Таблица 16: Средни стойности на VNAб в първите три месеца след завършване на ваксинационния курс и след поставяне на бустерна доза

	Месец 1	Месец 2	Месец 3
След завършване на ваксинационния курс	88.79	86.55	90.84
След поставяне на бустерна доза	96.38	95.83	95.46

В нашето проучване установихме имунен отговор с голям потенциал след завършване на ваксинационния курс, като много високи стойности на IgG срещу RBD-участъка се наблюдават до 90-ти ден от поставянето на втората доза. След това обаче се установява значителен спад, като средният такъв достига до 80% за период от 1 година и е по-силно изразен през първите 7 месеца. Въпреки това констатирахме 100% положителни за анти-RBD IgG индивиди до 210-тия ден и само 1/30 (3.33%) участник с отрицателен резултат в период III.

За IgA срещу Spike-протеина резултатите показаха по-малък процент на положителни пациенти. За период I – 88.8%, за период II – 59.26% и за период III – 36.36%. Въпреки това спадът в средните стойности е по-малък от този за IgG и отново за разлика от IgG, той не се отразява в максималните стойности, т.е. макар и индивидуално и в трите периода има участници с много високи резултати.

Най-малък е спадът на вируснеутрализиращия потенциал и той отново е по-силно изразен в първите 7 месеца. Въпреки това процентът на положителни индивиди е по-малък от този за IgG. За период I – 100%, за период II – 89.66% и за период III – 77.78%. И за трите периода се наблюдават максимални стойности от  $I > 90\%$ , но понижаване има при минималните стойности от 58.2% за период I до 36.2% и 35.1% съответно за период II и III.

Нашите резултати корелират и с получените от други проучвания. В едно от тях, при които е проследен хуморалния имунен отговор на 509 участници за период от 180 дни се посочват следните резултати. Антителата от клас IgG са над cut-off value при над 97% от индивидите до 90-тия ден и при 94.7% на ден 180. Много по-бързо е понижаването на положителните за IgA участници - от

86.9% на ден 42 до 39.6% на 90-тия [Speletas et al. 2022]. При други 300 проследени здравни работници до третия месец от завършване на ваксинационния курс се наблюдава 99.3% серопозитивност за IgG и вируснеутрализиращи антитела [Coppeta et al. 2021]. Почти същите са резултатите на всички останали споменати проучвания относно процента на положителни за IgG ваксинирани индивиди 2-4 седмици след поставяне на втората доза. В едно по-голямо проучване, направено за 6 месеца при 4868 участници се посочва спад от около 38% за IgG и 42% за вируснеутрализиращи антитела. Освен това се констатира, че колкото по-високи са стойностите в пиковия период, толкова по-голям е спадът в първите 70 дни от завършване на ваксинационния курс, като след това такава зависимост не се наблюдава [Levin et al. 2021]. Близък до този е и резултатът на 793 здравни работници, като спадът между 91-150 ден е 35.35%, а между 91-210 ден – 54.79%, което корелира и с получените от нас резултати [Coppeta et al. 2022]. Освен в нашето, в още едно изследване, получените резултати предполагат по-бавен темп на спад след шестия месец [Doria-Rose et al. 2021]. Много по-малко от нас положителни за вируснеутрализиращи антитела посочват Bayart и колектив, 6 месеца след ваксинация – 45% [Bayart et al. 2021]. По-различни са и резултатите при проследяване на 145 здравни работници, което, за разлика от нашето проучване, не показва статистически значима разлика между стойностите на IgG между 90-180 ден. Значима разлика в това изследване се посочва между 28-90 ден и 28-180 ден [Ciabattini et al. 2021].

По-малко проучвания са направени за стойностите и динамиката на антителата от клас IgA. Те показват високи стойности в пиковия период след ваксинация, но много по-бърз спад, сравнено с IgG. Повечето от тях показват под 20% положителни за IgA ваксинирани след 12 месеца, което е по-малко от установения от нас процент [Speletas et al. 2022; Wisnewski et al. 2021]. В своето изследване, Nikolova и колектив наблюдават две групи пациенти в зависимост от стойностите на IgA – при едните се наблюдават високи, а при други много ниски и отрицателни резултати за IgA [Nikolova et al. 2022]. Тези данни съответстват и на установените от нас много високи максимални стойности при някои индивиди дори и след 12 месеца и отрицателни резултати при други дори и в периода на пик за IgG. Може да се направи заключение, че образуването на антитела от клас IgA е строго индивидуално и не корелира със стойностите на IgG. Следователно, за да се направи добра оценка на хуморалния имунен отговор след ваксинация е необходимо да

бъде проведено и изследване на IgA.

Относно влиянието на възрастта върху потенциала и продължителността на имунния отговор, наблюденията са противоречиви. В нашето проучване не открихме сигнификантна зависимост между стойностите на трите вида антитела в период I и възрастта. В някои проучвания също не се открива значима корелация [Wei et al. 2021; Wheeler et al. 2021; Wu et al. 2022]. Други автори посочват силен имунен отговор при всички възрасти, но пониски стойности на IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела и по-бърз спад при пациенти на възраст над 60 години, които са ваксинирани и не са боледували от COVID-19 [Speletas et al. 2022, Steensels et al. 2021; Terpos et al. 2021; Pellini et al. 2021].

Ние не открихме корелация между наличието, вида и продължителността на страничните реакции след ваксинация и стойностите на антителата в период I. Малко други изследователи са направили подобна оценка и при повечето резултатът е сходен с нашия [Speletas et al. 2022]. В своето изследване Speletas и колектив откриват положителна зависимост между наличието на обща симптоматика (треска, болка в мускулите) след поставяне на втората доза и стойностите на IgG на ден 42 от първата, но посочват, че след 3-тия месец такава зависимост не се наблюдава [Speletas et al. 2022].

След като беше констатиран спад в стойностите на антителата и понижаване ефективността на ваксините след 6 месеца, особено срещу обезпокоителните варианти, започна прилагането на бустерна доза. Нашето 3-месечно проследяване на стойностите на антителата показва 100% положителни резултати за IgG и VNAb във всички месеци. Относно концентрациите на IgA, в месец 2 от трима пациенти, при 1 стойността на IgA е отрицателна.

В своето проучване Busa и колектив проследяват същия брой пациенти (n=11), при които са поставени три дози като правят измервания три седмици и 9 месеца след поставяне на втора доза и три седмици след бустера. Техните резултати са близки до нашите и показват спад през деветте месеца от завършване на ваксинационния курс и по-високи стойности на IgG и IgA след поставянето на трета доза в сравнение с пиковите стойности постигнати от двете дози [Busa et al. 2022]. Проучването на Mihaylova и колектив обхваща 49 пациенти до 9 месеца след завършване на ваксинационния курс и 3 месеца след поставянето на бустерна доза и установява понижаване на IgG, IgA и VNAb след 6-тия месец, но високи стойности на трите параметъра до 3-тия месец след

поставяне на бустерната доза. Те посочват, че стойностите при ваксинирани с бустерна доза са съпоставими с тези в пиковия период след завършване на ваксинационния курс [Mihaylova et al. 2023]. Друго по-голямо изследване проследява общо 1353 здравни работници и също показва по-високи стойности на антителата и по-висок процент вирусна инхибиция след поставяне на третата доза, сравнено с тези, които са измерени след поставяне на втората доза. В това проучване също е показана и по-добра ефективност срещу варианта Omicron на SARS-CoV-2 на серумите, изследвани след бустерната доза [Debes et al. 2022]. Освен по-високи стойности, повечето автори доказват и повишена вируснеутрализираща активност на серумите от ваксинирани с бустерна доза. Спрямо вариантите Beta, Delta, Omicron, тя е по-висока в сравнение с тази в пиковия период след поставяне на втора доза, но е по-ниска в сравнение с активността срещу „дивия“ тип. Различните автори показват различни степени на понижаване във вирусната инхибиция, като най-резистентен е псевдовирусът B.1.1.529 (Omicron) [Garcia-Beltran et al. 2022; Nemet et al. 2022]. В своето изследване Wu и колектив посочват, че вируснеутрализиращата активност спрямо Omicron след третата доза е близка до тази срещу Delta след втора доза [Wu et al. 2022]. Въпреки наблюдаваната понижена активност, обсервационно проучване в Израел показва по-малка честота на инфекциите и хоспитализациите при ваксинираните с бустерна доза индивиди над 60 години [Bar-On et al. 2021].

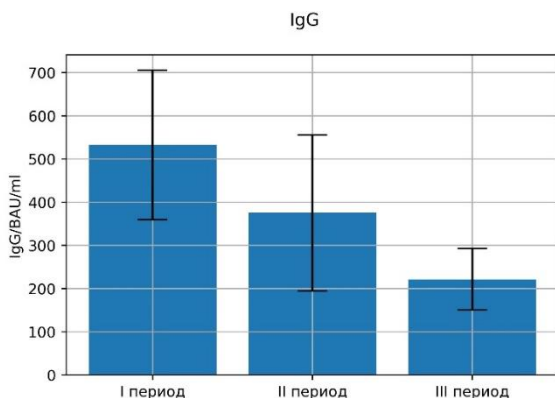
### **Раздел III. ХИБРИДЕН ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР**

#### **III.1. Хуморален имунитет при ваксинирани след преболедуване**

В нашето проучване е проследен и хуморалният имунен отговор при част от преболедевалите работници, които в последствие са били ваксинирани. От включените в изследването 103 преболедевали здравни работници, 32-ма са ваксинираните, като при тях е изпълнен пълният ваксинационен курс в зависимост от условията на производителя. Данните са разделени по периоди както за предходните две групи, като дните се смятат от деня на поставяне на втората доза. За 14 индивиди (14/32) е налична информация относно антителата в поне два от периодите

### III.1.1. Антитела от клас IgG

За нито един от периодите не се наблюдават отрицателни стойности както при проследените пациенти (n=14), така и при останали 18, за които разполагаме с еднократни изследвания. При изчисление на средните стойности са включени следния брой данни: за I период – 12 изследвания, за период II – 14 и за период III – 7. Динамиката в средните стойности на IgG е представена на фигура 13. Максималните, минималните и средните стойности са представени на таблица 17.



Фигура 13. Средни стойности на антителата от клас IgG при ваксинирани след боледуване в период I, II и III

Таблица 17: Минимални, максимални и средни стойности на IgG, измерени при ваксинирани след боледуване в трите периода

Период	Минимална стойност/ BAU/ml	Максимална стойност/ BAU/ml	Средна стойност/ BAU/ml
Период I	134.178	766.237	532.5
Период II	126.046	778.638	375.28
Период III	115.271	300.884	221.59

През първите седем месеца не се наблюдава промяна в максимално измерените стойности, но е налице спад в средните стойности, който е по-силно изразен отново между I и II период, отколкото между II и III период. Резултатите от статистическия анализ на данните между трите периода са представени на таблица 18.

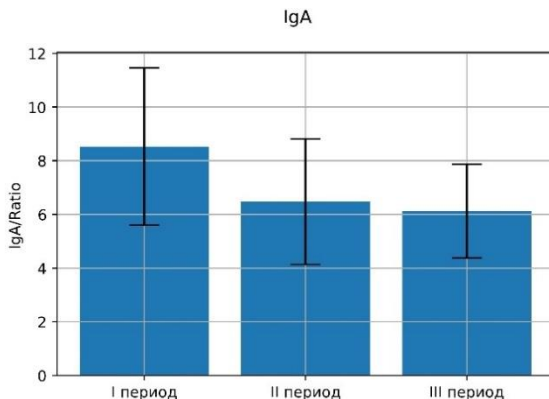
*Таблица 18: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgG в трите периода при индивиди с хибриден хуморален имунитет, изразени чрез p-value и процент на спад:*

<b>No период vs No период</b>	<b>p-value</b>	<b>Спадане в %</b>
I vs II	0.04	29.52
II vs III	0.053	40.95
I vs III		58.39

От направения анализ може да се твърди, че съществува статистически значима разлика между период I и II. Стойността на p-value между II и III период е гранична. На базата на нея не може да се твърди със сигурност, че съществува статистически значима разлика, но се наблюдава такава тенденция. Съответно при по-голям брой данни е твърде вероятно тази зависимост да се потвърди. При изчисляване процента на спад обаче се вижда, че процентът на спад между II и III период е по-голям от този между I и II период. Това разминаване при различните начини на статистическа обработка е резултат от широкия диапазон на получените резултати и по-малкия брой на изследвани участници в тази група. Неоспорима е обаче тенденцията, която се наблюдава в динамиката на IgG.

### **III.1.2. Антитела от клас IgA**

Броят на изследванията на IgA за различните периоди е следния: за период I – 11, период II – 13 и период III – 7. И тук, като за IgG не са отчетени отрицателни стойности при всички участници в проучването. На фигура 14 е представена динамиката в средните стойности на IgA за трите периода. Максималните, минимални и средни стойности са представени на таблица 19.



*Фигура 14. Средни стойности на антитела от клас IgA при ваксинирани след боледуване в период I, II и III*

*Таблица 19: Минимални, максимални и средни стойности на IgA, измерени при ваксинирани след боледуване в трите периода*

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
Период I	R = 2.48	R = 14.48	R = 8.53
Период II	R = 3.22	R = 12.09	R = 6.48
Период III	R = 3.29	R = 9.2	R = 6.12

Забелязват се високите резултати на Ratio както за минималните, така и за максималните стойности. Също така е налице тенденция за спад, като данните от статистическата обработка са представени на таблица 20.

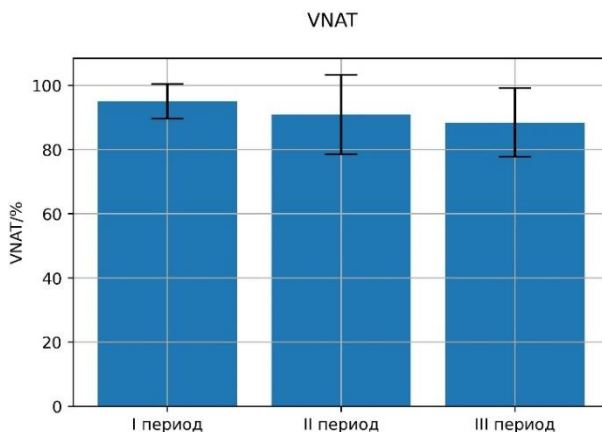
Не се открива статистически значима разлика между отделните периоди и процентът на спад е по-нисък в сравнение с IgG при тази група участници. Следва обаче да бъде отбелязано, че броят на изследванията е по-малък, което може да повлияе върху валидността на получените изводи. Със сигурност тенденция на спад се забелязва, като тя е по-силно изразена в първите 7 месеца.

Таблица 20: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgG в трите периода при индивиди с хибриден хуморален имунитет, изразени чрез p-value и процент на спад:

No период vs No период	p-value	Спадане в %
I vs II	0.082	24.03
II vs III	0.743	5.6
I vs III		28.25

### III.1.3. Вируснеутрализиращи антитела

При всички пациенти, при които за изследвани антитела от клас IgG, е изследван и вируснеутрализиращият потенциал. Съответно броят им е: период I – 12, период II – 14 и период III – 7. Както за IgG и IgA в нито един от периодите не се откриват пациенти с отрицателни резултати. Динамиката в средните стойности е показана на фигура 15.



Фигура 15. Средни стойности на процента вирусна инхибция при ваксиниране след боледуване в период I, II и III.

На таблица 21 са дадени стойностите за различните периоди.

*Таблица 21: Минимални, максимални и средни стойности на VNAб, измерени при ваксинирани след боледуване в трите периода*

<b>Период</b>	<b>Минимална стойност</b>	<b>Максимална стойност</b>	<b>Средна стойност</b>
Период I	I = 79.5%	I = 98.1%	I = 95.08 %
Период II	I = 49.6%	I = 97.7%	I = 90.9%
Период III	I = 66.8%	I = 96.6%	I = 88.43%

Забелязва се относително стабилно ниво и за трите стойности през всичките периоди. От статистическите тестове може да се направи категоричното заключение, че не се открива статистически значима разлика между период I и II ( $p = 0.307$ ) и между период II и III ( $p = 0.672$ ). Процентът на спад също е незначителен, като общо за целия период на проучване е около 7%.

#### **III.1.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при ваксинирани след боледуване**

При изследвания на корелационния коефициент на Pearson между стойностите на антителата в период I с възрастта и наличие на постваксинални реакции, наблюдавахме следните зависимости. Значителна отрицателна корелация ( $R = -0.67$ ,  $p = 0.024$ ) установихме между стойностите на IgA и възрастта, т.е. по-ниски стойности бяха констатирани при покачване на възрастта. Относно постваксиналните реакции и стойностите на трите параметъра, установихме следните корелационни зависимости. Установихме значителна корелация между стойностите на IgG в период I и продължителността на симптомите след I доза ( $R = 0.67$ ,  $p = 0.017$ ). Значителна беше и корелацията между стойностите на IgA в период I и наличието на обща симптоматика след поставянето на първата доза ( $R = 0.6$ ,  $p = 0.04$ )

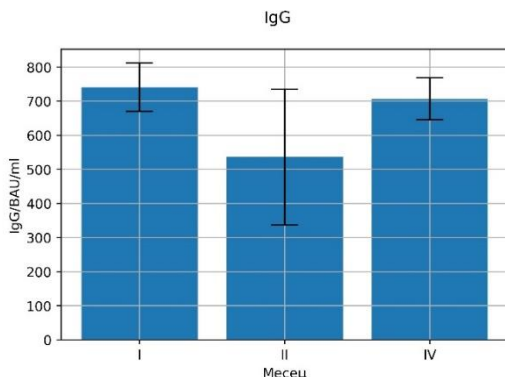
#### **III.2. Хуморален имунитет при преболедували след ваксиниране**

В хода на проучването е проследен хуморалния имуен отговор при 9 ( $n = 9$ ) работници, при които е установена SARS-CoV-2 инфекция след завършване на ваксинационния курс. Наблюдението е направено за период от 4 месеца, като броят на направените

изследвания е следният: месец 1 – 4 (n=4), месец 2 – 2 (n=2), месец 3 – 0, месец 4 – 3 (n=3).

### III.2.1. Антитела от клас IgG

При всички пациенти са измерени стойностите на IgG, като динамиката на средните стойности е представена на фигура 16.



Фигура 16. Средни стойности на антитела от клас IgG след „пробивна инфекция“ в месец 1, 2 и 4.

Поради малкия брой изследвания не може да се направи статистически значим анализ за динамиката на антителата. Максималните стойности обаче са високи като за месец 1 при двама от участниците (2/4) са измерени над 800 BAU/ml, а при останалите двама те са малко под 700 BAU/ml. За месец 2 са установени следните стойности: 337.478 BAU/ml и 734.523 BAU/ml. В месец 4 получените резултати са както следва: 735.336 BAU/ml, 622.098 BAU/ml и 764.408 BAU/ml.

### III.2.2. Антитела от клас IgA

Броят на направените изследвания за IgA по месеци е малък и не би могло да се даде анализ на динамиката на този вид антитела. За месец 1 са направени 4 изследвания, като резултатите на ratio са: R=9.7; R=8.31; R=8.64 и R=8.92, за месец 2 има само едно изследване с R = 1.85 и за месец 4 има два резултата - съответно R = 9.43 и R = 8.17.

### **III.2.3. Вируснеутрализиращи антитела**

На фона на дадените стойности за IgG и IgA се наблюдава висок потенциал на вирусна неутрализация за всички месеци при всички пациенти. Стойността на I (процент вирусна инхибция) при всички, с изключение на един пациент (в месец 2), е над 90%.

От изложените данни за IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела се установява имунен отговор с образуване на голямо количество антитела от изследваните класове. По-слаб отговор се наблюдава само при един пациент, при който IgG = 337.478 BAU/ml, IgA = 1.85 (Ratio) и за VNAb I = 79%. За този пациент няма данни за имunosупресия или хронични заболявания. От анамнезата се разбира, че при него е приложена векторната ваксина на Janssen около 2 месеца преди боледуването. Освен това 1 месец след ваксинация е направено изследване на IgG и резултатът е бил отрицателен. Следователно при този пациент имунният отговор след ваксинация е малък или отсъстващ, което води до стойности на антителата по-близки до тези само на преболедували пациенти.

### **III.2.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при боледували след ваксиниране**

При определяне корелационния коефициент в тази група между стойностите на трите параметъра в месец 1 след боледуването с възрастта и начина на протичане на заболяването установихме следното. Не беше констатирана сигнификантна корелация между възрастта и стойностите на трите параметъра в тази група. Относно тежестта на протичане на заболяването установихме много висока корелация между продължителността на симптомите и стойностите на вируснеутрализиращи антитела ( $R=0.99$ ,  $p=0.031$ ).

Като хибриден се обозначава имунитет, придобит от инфекция и ваксинация без значение от реда на поява на събитието. Въпросът за ваксиниране на преболедували пациенти беше силно дискутиран особено в условията на недостиг на одобрените ваксини. Ние наблюдавахме имунен отговор с голям потенциал и стабилност, особено изразена в процентите на вирусна инхибция. Всички изследвани участници бяха положителни за IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела в 12-месечния период на проследяване. Въпреки, че беше наблюдаван спад, стойностите се запазиха високи, а средните нива на VNAb бяха около и над 90%.

Повечето проучвания при преболеждали пациенти, които след това са ваксинирани, са направени при еднократен режим за двете иРНК ваксини или поставяне на една доза от ваксината Ad.26.Cov2. Те показват имуноен отговор, който започва още на 7 ден след поставянето ѝ, дори и при индивиди с отрицателни стойности на антителата. Това предполага наличие на имунна памет и възможност за бърз имуноен отговор с висок потенциал повече от 10 месеца след боледуване [Ontañón et al. 2021]. Стойностите на антителата след една доза са съпоставими с тези на ваксинирани и неболеждали след две дози. След поставяне на втората доза не се наблюдава повишаване на антителата или промяна в процента на вирусна инхибиция при преболеждалите [Fraleley et al. 2021; Levi et al. 2021; Trougakos et al. 2021].

Относно дългосрочната динамика на антителата се откриват по-малко проучвания, с които да сравним нашите резултати. При проследяване на 63 здравни работници, 2 месеца след ваксинацията, се откриват по-ниски стойности на антителата при ваксинираните, но неболеждали индивиди [Ontañón et al. 2021]. Имуноен отговор с голям потенциал и продължителност се открива и при 6-месечно проследяване на 123 ваксинирани след инфекция от SARS-CoV-2. Освен това не се наблюдава значителен спад за посочения период [Glück et al. 2022]. Друго по-голямо изследване, върху 2003 участници, показва, че след 6 месеца 81% от ваксинираните индивиди имат отрицателни резултати за анти-RBD IgG, докато 98% от ваксинираните и преболеждали показват стойности над cut-off value. Освен това средните положителни стойности в първата група са по-ниски от тези във втората за същия период [Batra et al. 2023]. В своето проучване Perez-Alos и колектив също посочват високи и стабилни нива на IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела без значение от начина на протичане на инфекцията и вида на поставената ваксина (векторна или иРНК) [Perez-Alos et al. 2022]. Всички 1754 участници се били с положителни резултати за споменатите параметри на хуморалния имуноен отговор за периода на изследване – 230 дни, което се потвърждава и от нашите наблюдения. Само в едно от изследванията, което е проведено с 61 индивиди, се посочва еднакъв темп на спад на антителата при преболеждали и ваксинирани и само ваксинирани, което е в противоречие с направените от нас и повечето други автори изводи [Goel et al. 2021].

Относно протективния ефект на хибридно придобития имунитет национално проучване в Катар, което обхваща над милион и половина жители, показва по-малък риск от „пробивни инфекции“ след преболедуване и ваксиниране, сравнено със само ваксинирани индивиди [*Abu-Raddad et al. 2021*]. Същият резултат е получен и в национално израелско проучване с обхват от над 5 милиона индивиди, което показва, че в еднакъв период след ваксинацията в групата на участниците, за които има данни за минала инфекция, е по-малък процентът на „пробивни инфекции“ [*Goldberg et al. 2022*].

Нашият анализ показва значителна отрицателна корелация между възрастта и стойностите на IgA, но не открихме такава зависимост за IgG и VNAb. В две проучвания е направена такава оценка при тази група индивиди и те не посочват възрастта като фактор при образуването на имунния отговор след ваксинация на преболедували пациенти [*Steensels et al. 2021; Tut et al. 2021*]. Относно корелацията, която установихме между стойностите на IgG и IgA и поствакциналните реакции, проучванията посочват, че често се наблюдават поставакцинални реакции при преболедували, но оценка за влиянието им върху имунния отговор при тях не е направена. В някои изследвания при само ваксинирани резултатите не показват такава зависимост [*Speletas et al. 2021; Röltgen et al. 2021; Gobbi et al. 2021*].

В хода на проучването беше изследван имунният отговор при 9 участници, при които настъпи инфекция от SARS-CoV-2 след ваксиниране. При 7 от тях (7/9) е поставена ваксината на Pfizer, като при 6 завършването на ваксинационния курс е бил 8-10 месеца преди поява на инфекцията, а при един от тях – 4 месеца. Продуктът на Janssen/Johnson&Johnson е поставен при 2 (2/9), при които боледуването е настъпило на 1-ви и 3-ти месец след ваксинация. Инфекциите са възникнали в периода август 2021- януари 2022, когато в Европа и България бяха разпространени вариантите Delta и Omicron на SARS-CoV-2. Имуният отговор след инфекция на фона на ваксинация е изследван в няколко проучвания, които установяват повишаване стойностите на IgG, IgA и процента на вирусна неутрализация. Повечето автори посочват, че придобитият по този начин имунитет е с по-голям потенциал и продължителност, в сравнение с този само след ваксинация и само преболедуване. Доказва се и значителен имунитет на лигавиците, който почти липсва при ваксинирани индивиди, които не са боледували. По-силно изразена е Fc-ефекторната функция, свързаното и

неутрализирането на вируса. Освен това повечето изследвания показват, че хибридният имунитет е с по-голям неутрализиращ потенциал и кръстосана реактивност към различните варианти на SARS-CoV-2, включително и B.1.1.529 (Omicron) [Yang et al. 2022; Walls et al. 2022; Collier et al. 2022; Kitchin et al. 2022]. Посочва се и значението на интервала между ваксинацията и инфекцията, като имунен отговор с по-широк вируснеутрализиращ потенциал, ефективен при повече варианти, се наблюдава при по-голям интервал [Miyamoto et al. 2022].

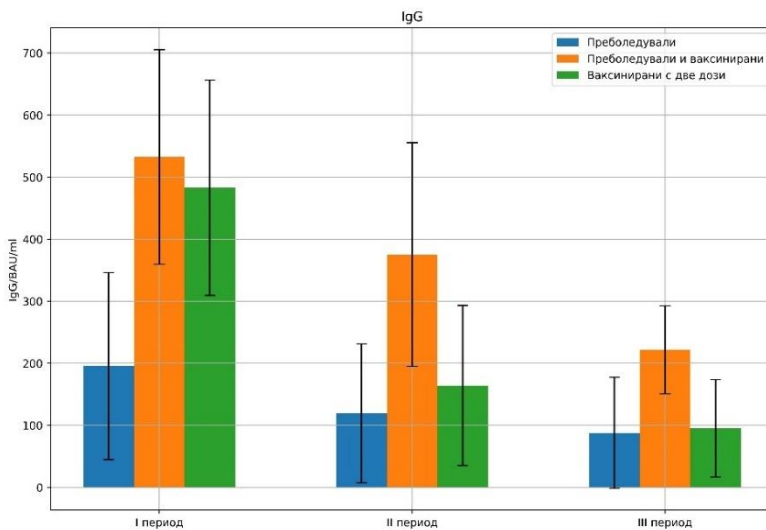
Относно реда на поява на събитията – инфекция и ваксинация, едно изследване сравнява имунния отговор при 62 участници с хибриден имунитет, по 31 във всяка група в зависимост от последователността на събитията и не показва разлика в имунния отговор между тях [Bates et al. 2022]. Направените от нас и други автори наблюдения показват, че хуморалният имунитет, придобит от инфекция и ваксиниране, без значение от това кое явление е първо, е с голям потенциал и продължителност и показва кръстосана реактивност срещу различните варианти на SARS-CoV-2.

## **Раздел IV. СРАВНЕНИЕ НА ХУМОРАЛНИЯ ИМУНИТЕТ ПРИ ПРЕБОЛЕДУВАЛИ, ВАКСИНИРАНИ НЕБОЛЕДУВАЛИ И ВАКСИНИРАНИ СЛЕД БОЛЕДУВАНЕ**

### **IV.1. Сравнение на антитела от клас IgG**

На фигура 17 са представени средните стойности на трите групи пациенти: преболедували, ваксинирани с две дози и преболедували и ваксинирани. На графиката се вижда, че средните стойности са най-високи и в трите периода в групата на ваксинираните и преболедували пациенти. За период I средните стойности на IgG са по-високи при ваксинираните в сравнение с преболедувалите здравни работници, но поради по-бързия темп на спад при ваксинираните, след 4-тия месец стойностите започват да се изравняват, като в период III те са почти еднакви.

Данните от статистическия анализ (p-value) между средните стойности за трите периода при различните групи пациенти е представен в таблица 22:



Фигура 17. Средни стойности на антителата от клас IgG при преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани след боледуване в период I, II и III

Таблица 22: Стойности на *p-value*, получени при статистическия анализ на средните стойности на IgG за трите групи между трите периода

	Период I	Период II	Период III
Преболедували vs Преболедували и ваксинирани	0.0001	0.0001	0.001
Преболедували vs Ваксинирани	0.0001	0.129	0.745
Преболедували и ваксинирани vs Ваксинирани	0.39	0.0001	0.001

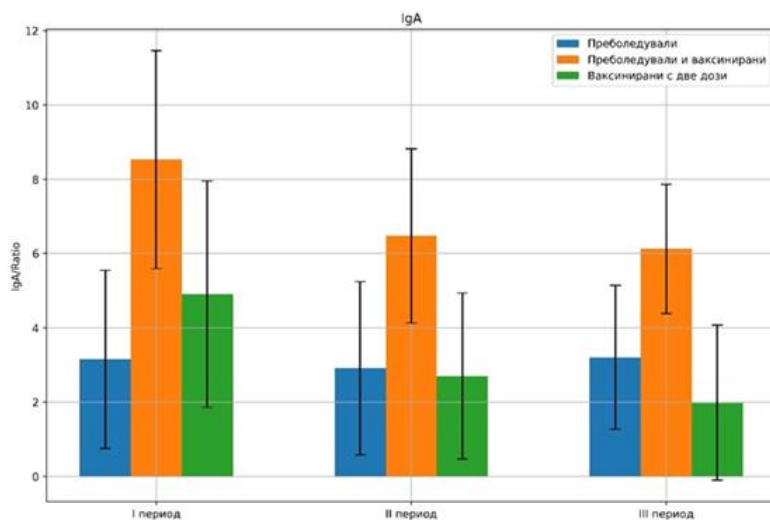
От анализа установихме следните зависимости: и в трите периода се наблюдава статистически значима разлика между средните стойности за преболедувалите в сравнение с преболедувалите и ваксинирани участници. От получените данни може да се направи заключение, че при ваксиниране на фона на предишно боледуване се образуват повече антитела от клас IgG, отколкото само при преболедуване. В период III обаче се наблюдава макар и слабо повишаване на p-value, което може да е индикатор за малко по-бързия спад на антителата в групата на участниците с хибриден хуморален имунитет. Тези данни са в съответствие с изложеното в т. I.1. и т.III.1 - понижаването на антителата между период I и III за преболедувалите е 55,05%, а при преболедувалите и ваксинирани е 58,39%.

Между групите на само преболедували и само ваксинирани се установява статистически значима разлика в средните стойности на IgG за период I. За следващите два периода обаче такава не се наблюдава, като стойността на p – value се повишава във времето. Това е резултат от изложения в т. II.1 спад на IgG между I и III период от 80.28% за завършилите ваксинационен курс.

## **IV.2. Сравнение на антителата от клас IgA**

Средните стойности за ratio на антителата от клас IgA за трите периода при отделните групи са представени на фигура 18. Отново най-високи са стойностите и за трите периода в групата на преболедували и ваксинирани, въпреки наблюдавания спад. При преболедувалите не се установява понижаване и така в период III при тях стойностите са по-високи, отколкото при ваксинираните и неболедували участници.

Данните от статистическия анализ (p-value) между средните стойности за трите периода при различните групи пациенти е представен в таблица 23. От стойностите на p-value се наблюдават следните зависимости: между групата на преболедували и тази на преболедували и ваксинирани се установява статистически значима разлика за трите периода. В период III се наблюдава повишение на p-value, което е резултат от липсата на спад на IgA при преболедували (т. I.2.) и наличието на такъв при преболедували и ваксинирани пациенти (т. III.2 – 28.25% между период I и III).



*.Фигура 18. Средни стойности на антителата от клас IgA при преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани след боледуване в период I, II и III*

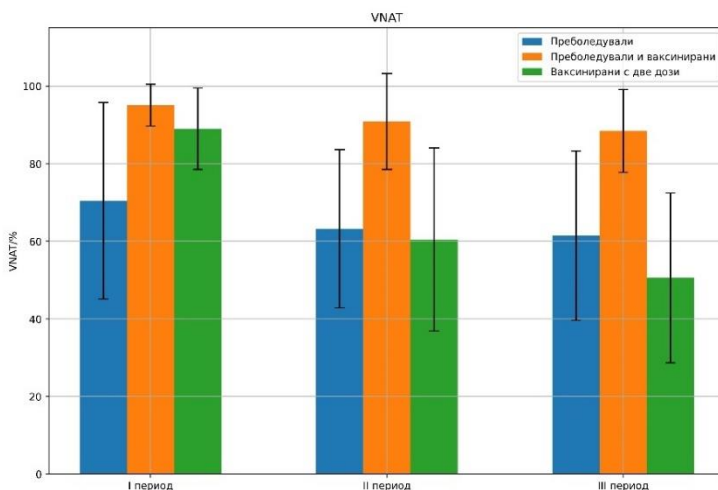
Между групите на само преболедували и само ваксинирани се установява статистически значима разлика в период I, като тогава образуваните антитела от клас IgA са повече при ваксинираните пациенти. В период II не се установява значима разлика. В период III обаче такава има, като тук стойностите са по-високи в групата на преболедували пациенти. Това показва по-бързия темп на спад за IgA при ваксинираните (от т. II.2. – 59.47% между период I и III). Статистически значима разлика се установява и в трите периода между преболедували и ваксинирани и само ваксинираните индивиди. Стойността на p-value тук намалява с времето, резултат от бързия спад при ваксинираните пациенти.

Таблица 23: Стойности на p-value, получени при статистическия анализ на средните стойности на IgA за трите групи между трите периода

	Период I	Период II	Период III
Преболедували vs Преболедували и ваксинирани	0.0001	0.0001	0.002
Преболедували vs Ваксинирани	0.043	0.736	0.05
Преболедували и ваксинирани vs Ваксинирани	0.002	0.0001	0.0001

### IV.3. Сравнение на вируснеутрализиращите антитела

Сравнението на вируснеутрализиращия потенциал във всички периоди за трите групи пациенти е показано на фигура 19.



Фигура 19. Средни стойности на процента вирусна инхибция при преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани след боледуване в период I, II и III

Наблюдава се корелация с данните за IgG и IgA, като тук отново в период I най-ниски са стойностите за преболедували пациенти, но на фона на различния темп на спад в период III, те са по-високи от тези при ваксинираните. От статистическия анализ се потвърждават зависимостите, наблюдавани в графиката, като резултатите за p-value са показани на таблица 24:

*Таблица 24: Стойности на p-value, получени при статистическия анализ на средните стойности на VNAb за трите групи между трите периода*

	Период I	Период II	Период III
Преболедували <b>vs</b> Преболедували ваксинирани и	0.003	0.0001	0.005
Преболедували <b>vs</b> Ваксинирани	0.001	0.65	0.089
Преболедували и ваксинирани <b>vs</b> Ваксинирани	0.071	0.0001	0.0001

Между преболедувалите и преболедувалите и след това ваксинирани се пациенти се наблюдава статистически значима разлика и в трите периода. Между преболедувалите и ваксинирани и само ваксинирани пациенти в период I не се установява статически значима разлика, но в период II и III такава има, резултат от по-бързия спад на антителата при ваксинирани пациенти. При сравнение на само преболедували и само ваксинирани се установява значима разлика в период I, когато стойностите са по-високи в групата на ваксинирани пациенти. В период II разлика не се установява, т.е. между 4 -7 месец те имат почти еднакви резултати. В период III се наблюдава понижаване на p-value, като в този период стойностите на VNAb са по-високи при преболедувалите пациенти, но не се открива статистически значима разлика между двете групи.

Повечето проучвания показват близки до нашите наблюдения. Едно от тях включва 39 преболедували и ваксинирани и 27 ваксинирани, серонегативни преди това пациенти и показва ниска вируснеутрализираща активност след боледуване или ваксинация срещу обезпокоителните варианти. Най-ниска такава се

посочва в групата на само ваксинирани участници. При пациентите с хибриден имунитет стойностите на антителата са най-високи и са стабилни във времето [Mantus et al. 2022]. В своето изследване Perez-Alos и колектив посочват също значително по-високи концентрации на IgA , IgG и VNAb при участниците с хибриден имунен отговор в сравнение с ваксинираните и по-малък спад за периода на проследяване – 230 дни [Perez-Alos et al. 2022]. Повисоки пикови стойности при ваксинирани, но липса на разлика в резултатите между само ваксинирани и само преболедували след 6 месеца е констатирано в друго изследване [Cho et al. 2021]. Получените от нас резултати при сравнение на трите групи пациенти се посочват в още едно голямо изследване, което обхваща общо 1081 участници [Forgacs et al. 2022]. Изследвайки свързващата активност на антителата, Struck и колектив показват, че при преболедували тя е много по-ниска, отколкото при ваксинирани, т.е. след ваксинация при сероположителни и серонегативни преди това имунитетът е напрегнат и води до по-бърз имунен отговор към вируса, понижавайки риска от инфекция [Struck et al. 2021]. На фона на нашия и споменатите до момента трудове, проучване върху 45 ваксинирани серонегативни преди това и 18 ваксинирани след инфекция участници не показва разлика в дългосрочната динамиката на антителата от клас IgG [Goel et al. 2021].

В научната общност остава въпросът дали потенциалът и продължителността на имунния отговор зависят от начина на придобиването му (преболедване, ваксиниране или хибридно) или само от броя срещи с антигена на вируса. Нашето проучване показва високи стойности на антителата в първите три месеца след ваксиниране на боледували пациенти, след пробивни инфекции и след поставяне на бустерна доза. Walls и колектив показват в своето проучване, че без значение от вида, броят на срещите с антигена е от значение за качеството и стабилността на имунния отговор [Walls et al. 2022]. Същото е наблюдението, направено в още едно проучване върху 173 индивиди [Wratil et al. 2022].

## 5. ОБОБЩЕНИЕ

Коронавирусите са суспектни за причинители на епидемии и пандемии още от началото на 21-ви век, когато са регистрирани SARS-CoV и MERS-CoV. С появата на SARS-CoV-2 и пандемията, която този вирус предизвика, беше поставен въпросът относно

продължителността и ефективността на придобития имунен отговор като един от най-важните фактори за прогнозиране хода на разпространението на вируса и изграждане на стратегии за елиминиране на пандемията.

След като повечето проучвания показаха нормална за вирусна инфекция кинетика на IgG, IgM и IgA антителата по време на инфекцията и в ранния реконвалесцентен период, остана въпросът с продължителността на придобития хуморален имунитет. Проучванията относно SARS-CoV и MERS-CoV показват детекция на антитела и вируснеутрализираща активност до 2-3 години след преболедуване. Проучванията относно дългосрочната динамика на антителата при SARS-CoV-2 също показаха наличие на IgG и вируснеутрализиращи антитела (VNAб) повече от една година след инфекцията. В настоящето изследване беше показан по-малък спад на IgG и VNAб като процентът на спад в средните стойности между период I и III беше 55% за IgG и 12.76% за VNAб и така положителни резултати бяха установени при повечето участници една година след преболедуване. Проучванията върху стойностите на антителата от клас IgA показват различни резултати. Ние не установихме спад в средните стойности, което корелира и с резултатите, представени от други автори. Някои изследвания обаче показват бърз спад на антителата от клас IgA в първите месеци след инфекция със SARS-CoV-2.

С оглед тежкото протичане на заболяването при някои пациенти и значителните социални и здравни щети, причинени от разпространението на вируса, една от основните стратегии за справяне с пандемията беше изработването и прилагането на ваксини. За първи път беше въведена за масова употреба иРНК ваксини, кодиращи определени вирусни антигени. Проучванията показаха серопозитивност при над 90% от ваксинираните и високи стойности на антителата в първите месеци след ваксинация, но бърз спад, който започва след третия месец и води до значително понижаване в стойностите на IgG, IgA и VNAб. В настоящето проучване също беше констатиран по-усилен спад като след седмия месец стойностите при само ваксинирани бяха близки до тези на само преболедевалите.

Хуморалният имунитет, придобит чрез преболедуване и ваксинация се обозначава като хибриден. При тази група бяха наблюдавани най-високи стойности на трите параметъра и по-бавен спад, в резултат на което, дори след 7-мия месец наблюдавахме средни стойности на вируснеутрализираща активност над 90%. Тези

резултати корелират и с полученото от други автори, които посочват високи стойности на IgG, IgA и VNAб, по-голяма продължителност на хибридният хуморален имунитет и по-висок афинитет на антителата. Някои проучвания показват и по-добра вируснеутрализираща активност на антителата към други варианти на вируса, което води до понижен риск от инфекции при индивиди, които са преболедували и ваксинирани.

Въпреки по-малкия брой на участници в настоящето проучване, то е едно от малкото такива, които проследяват три параметъра на хуморалния имунен отговор при ваксинирани, преболедували и индивиди с хибриден хуморален имунитет за период от 12 месеца. Изследването доказва необходимостта от прилагането на допълнителни дози при ваксинирането на непреболедували лица и ползите от ваксинирането на преболедувалите. Установената от нас динамика в стойностите на изследваните параметри може да послужи за оптимизиране на ваксиналните стратегии в зависимост от експозиционния статус на индивида и популацията.

## **6. ИЗВОДИ**

1. При преболедували най-значителен спад беше установен в антителата от клас IgG за период от 12 месеца, най-изявен до 6-тия месец след инфекция. Средните стойности на IgA останаха непроменени в периода на проследяване.
2. При ваксинираните непреболедували установихме високи стойности на IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела в първите 3 месеца след ваксинацията, но значителен спад и в трите параметъра, основно между 3-7 месец, което води до силно понижаване в средните стойности след шестия месец.
3. Най-високи стойности на изследваните параметри бяха установени при ваксинираните и преболедували участници в хода на целия период на проследяване, които въпреки спада запазиха високи стойности до 12-тия месец.
4. До 4-тия месец след ваксинация установихме по-високи средни стойности на IgA при ваксинираните преболедували в сравнение с ваксинираните непреболедували. В същия период се наблюдаваха и значимо по-високи средни стойности на IgG, IgA и VNAб при двете групи ваксинирани индивиди в сравнение със само преболедувалите.

5. Установихме сигнификантно по-високи стойности на IgA след 7-мия месец при само преболедували в сравнение със само ваксинирани.
6. При преболедували установихме положителна корелация между стойностите на IgG и възрастта и между стойностите на IgA и тежестта на протичане на протичане на заболяването. При ваксинираните след боледуване установихме понижаване стойностите на IgA с покачване на възрастта, а тежките и продължителни постваксинални реакции се асоциират с по-високи стойности на IgG и IgA.

## **8. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ:**

### **8.1. ТЕОРЕТИЧНИ**

1. Проследяването на хуморалния имунен отговор при преболедували лица показва динамиката на антителата от клас IgG, IgA и VNAб за период от 12 месеца след инфекция.
2. Проследяването за период от 12 месеца на ваксинираните серонаивни и ваксинираните преболедували показва ефективността на иРНК ваксините при двете групи.
3. Сравнението в динамиката на имунния отговор при отделните групи откроя различията в потенциала и продължителността на имунитета, придобит по различните начини и показва най-голяма ефективност на имунния отговор, придобит едновременно чрез преболедуване и чрез ваксинация.

### **8.2. НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ**

1. Получените резултати показаха необходимостта от прилагане на допълнителни бустерни дози и от ваксинацията на преболедували индивиди.
2. Така установената динамика на хуморалния имунитет може да послужи за оптимизиране на националните ваксинални стратегии.
3. Резултатите може да бъдат използвани при определяне необходимостта от прилагане на ваксина на лицата в зависимост

от техния експозиционен статус и съответно индивидуалния им риск от възникване на реинфекции и пробивни инфекции.

## **9. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА НАСТОЯЩИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

### **9.1. Публикации в реферирани списания:**

1. **В. Пенчева**, С. Михайлова. Имунен отговор към SARS-CoV-2. Медицински преглед, 2022, 58(4): 16-24
2. **V. Pencheva**, S. Mihaylova. Vaccine – induced humoral immunity against SARS-CoV-2. Bulgarian Journal of Clinical Immunology, 2021, 14(1-2): 44-51
3. **V. Pencheva**, A. Kolevski, S. Mihaylova. “Comparison of anti-receptor binding domain of SARS-CoV-2 Spike protein humoral response between infected, vaccinated and vaccinated after natural exposure subjects over 12-months follow up period”. Comptes rendus de l’academiae bulgare des sciences, под печат

### **9.2. Участие в научни форуми и конгреси:**

1. **В. Пенчева**, С. Михайлова. Хуморален имунен отговор към RBD участъка на SARS-CoV-2 до 12 месеца след ваксинация на преболедали индивиди - Първа конференция по ваксинационни заболвания, 11-13 Ноември 2022г., хотел „Родина“, гр.София
2. **В. Пенчева**, С. Михайлова. 12-месечно проследяване на хуморалния имунен отговор към рецептор-свърващия домейн на SARS-COV-2 при преболедали, ваксинирани и ваксинирани след преболедаване индивиди - Годишна конференция по имунология, 16 Декември 2022г., гр.София

