



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

АНТИТЕЛЕН ОТГОВОР КЪМ RBD-УЧАСТЪКА НА SARS-COV-2  
ПРИ ВАКСИНИРАНИ, ПРЕБОЛЕДУВАЛИ И ВАКСИНИРАНИ  
СЛЕД БОЛЕДУВАНЕ ИНДИВИДИ

Д-р Виктория Данаилова Пенчева

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител: Доц. д-р Снежина Михайлова Кандиларова, д.м.

София, 2023

## СЪДЪРЖАНИЕ:

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....</b>	<b>4</b>
<b>ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР .....</b>	<b>7</b>
I. ВЪВЕДЕНИЕ .....	7
II. ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР .....	8
II.1. Структура на антителата .....	8
II.2. Синтез на антителата .....	9
II.3. Функции на антителата.....	10
II.4. Роля на антителата при вирусни инфекции.....	11
III. КОРОНАВИРУСИ .....	12
IV. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА SARS-COV-2 .....	14
IV.1. Структура на SARS-CoV-2.....	14
IV.2. SARS-CoV-2 – основни варианти .....	17
IV.3. Размножаване на вируса на SARS-CoV-2 и патогенеза .....	18
V. ИМУНЕН ОТГОВОР КЪМ SARS-COV-2 .....	20
V.1. Механизми на естествен имунитет срещу SARS-CoV-2 .....	20
V.2. Механизми на придобит имунитет срещу SARS-CoV-2 .....	22
V.2.1. Клетъчен имунитет.....	22
V.2.2. Хуморален имунитет.....	23
V.3. Зависимост между хуморалния имунен отговор и тежестта на протичане на заболяването .....	27
V.4. Други фактори повлияващи хуморалния имунен отговор.....	28
V.5. Продължителност на имунния отговор при първична инфекция .....	29
V.6. Хуморален имунитет и ре-инфекция .....	31
V.7. Кръстосана реактивност при коронавируса .....	32
VI. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИТЕЛА КЪМ SARS-COV-2 .....	33
VII. ВАКСИНОИНДУЦИРАН ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР .....	36
VII.1. Информационни РНК ваксини срещу COVID-19.....	36
VII.2. Векторни ваксини .....	38
VII.3. Продължителност на хуморалния имунитет след ваксинация срещу COVID-19 .....	39
VII.4. Ефикасност на ваксините при имunosупресирани пациенти.....	40
VII.5. Ефикасност на ваксините срещу SARS-CoV-2 при преболедували.....	42
VII.6. Значение на хуморалния имунитет срещу обезпокоителните варианти .....	44
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>47</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>49</b>
I. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ .....	49
II. МЕТОДИ .....	53
II.1. Изследване на антитела от клас IgG чрез Enzyme Linked Fluorescent assay (ELFA).....	53
II.2. Изследване на антитела от клас IgA чрез Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) .....	56
II.3. Изследване на вируснеутрализиращи антитела (VNAб) .....	60
II.4. Статистически анализ и обработка на данните.....	63
<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....</b>	<b>65</b>
<b>РАЗДЕЛ I. ХУМОРАЛЕН ИМУНитЕТ ПРИ ПРЕБОЛЕДУВАЛИ.....</b>	<b>66</b>
I.1. Антитела от клас IgG.....	66
I.2. Антитела от клас IgA.....	69
I.3. Вируснеутрализиращи антитела.....	72

I.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при преболедували .....	74
I.5. Обсъждане.....	75
I.5.1. Антитела от клас IgG срещу RBD на S - протеина .....	75
I.5.2. Антитела от клас IgA срещу Spike протеина .....	77
I.5.3. Вируснеутрализиращи антитела.....	79
<b>РАЗДЕЛ II. ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ПРИ ВАКСИНИРАНИ .....</b>	<b>81</b>
II.1. Хуморален имунитет при завършване на ваксинационния курс.....	81
II.1.1 . Антитела от клас IgG .....	81
II.1.2 . Антитела от клас IgA.....	83
II.1.3. Вируснеутрализиращи антитела .....	85
II.1.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при ваксинирани серонаивни .....	85
II.2. Хуморален имунитет при ваксинирани с бустерна доза .....	87
II.2.1 . Антитела от клас IgG .....	88
II.2.2 . Антитела от клас IgA.....	89
II.2.3. Вируснеутрализиращи антитела .....	90
II.3. Сравнение на хуморалния отговор между ваксинирани със завършен ваксинационен курс и поставилите бустерна доза .....	91
II.3.1 . Антитела от клас IgG .....	91
II.3.2 . Антитела от клас IgA.....	91
II.3.3. Вируснеутрализиращи антитела .....	92
II.4. Обсъждане.....	92
<b>РАЗДЕЛ III. ХИБРИДЕН ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР .....</b>	<b>98</b>
III.1. Хуморален имунитет при ваксинирани след боледуване.....	98
III.1.1 . Антитела от клас IgG .....	98
III.1.2 . Антитела от клас IgA.....	100
III.1.3. Вируснеутрализиращи антитела.....	101
III.1.4. Фактори, повлияващи имунния отговор при ваксинирани след боледуване .....	102
III.2. Хуморален имунитет при преболедували след ваксиниране.....	103
III.2.1 . Антитела от клас IgG .....	104
III.2.2 . Антитела от клас IgA.....	104
III.2.3. Вируснеутрализиращи антитела.....	105
III.2.4. . Фактори, повлияващи имунния отговор при боледували след ваксиниране .....	105
III.3. Обсъждане.....	106
<b>РАЗДЕЛ IV. СРАВНЕНИЕ НА ХУМОРАЛНИЯ ИМУНИТЕТ ПРИ ПРЕБОЛЕДУВАЛИ, ВАКСИНИРАНИ НЕБОЛЕДУВАЛИ И ВАКСИНИРАНИ СЛЕД БОЛЕДУВАНЕ .....</b>	<b>111</b>
IV.1. Сравнение на антителата от клас IgG .....	111
IV.2. Сравнение на антителата от клас IgA .....	113
IV.3. Сравнение на вируснеутрализиращите антитела .....	114
IV.4. Обсъждане.....	116
<b>ОБОБЩЕНИЕ .....</b>	<b>119</b>
<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>122</b>
<b>СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ .....</b>	<b>123</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЯ .....</b>	<b>124</b>



## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

### На латиница:

ACE2 – Angiotensin-converting enzyme 2

CD – Cluster of differentiation

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CLIA - Chemiluminescent immunoassay

CRP – C-reactive protein

CTSB - cathepsin B

CTSL - cathepsin L

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay

ELFA - Enzyme-linked fluorescence assay

FITC - Fluorescein isothiocyanate

FP - Fusion peptide

G-CSF - Granulocyte – colony stimulating factor

HLA – Human leucocyte antigen

HR – Heptad repeat

HRP - Horseradish peroxidase

IFN – Interferon

Ig – Immunoglobulin

IL – Interleukin

IP-10 – interferon - $\gamma$  inducible protein 10

IRF - Interferon regulatory factor

LFIA - Lateral-flow immunoassay

MASP - Mannose – binding protein associated protease

MCP - macrophage chemoattractant protein

MDA5 - Melanoma-differentiation associated gene 5

MERS - Middle East respiratory syndrome

NF- $\kappa$ B – Nuclear factor kappa beta

NK – Natural killer

NLR- Nod-like receptor

NRP-1 - neuropilin-1

NTD – N-terminal domain

OD – Optical density

PAMPs - Patogen Associated Molecular Patterns

PD1- Programmed cell death protein 1

PPRs - Pattern Recognition Receptors

RBD – Receptor binding domain

RBM – Receptor binding motif

RFV -Relative fluorescence value

RIG-I - Retionic Acid-Inducible Gene – I

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

SARS – Severe Acute respiratory syndrome

SPR - Solid Phase Receptacles

Tfh - helper T-follicular cells

Th – T helper cells

TIM -3 - T- cell immunoglobulin mucin – 3

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

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### I. ВЪВЕДЕНИЕ

Коронавирусите са голяма група РНК-вируси, широко разпространени сред бозайници и птици. Известно е, че 6 вида коронавируси са причинители на заболявания сред човешката популация. Четири от тях са ендемични човешки вируси – *HCoV-229E*, *HCoV-NL63*, *HCoV-OC43* и *HCoV-NKU1*. Другите два вида – тежък респираторен синдром коронавирус (*SARS-CoV-1*, 2002) и коронавирус в Близкия изток (*MERS-CoV*, 2012) имат зооотичен произход и могат да доведат до тежки пневмонии с летален изход [1-3].

През декември 2019 г. в Ухан, Китай беше идентифициран нов коронавирус, наречен *SARS-CoV-2* от International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) или *COVID-19* вирус от World Health Organization (WHO) [4]. *SARS-CoV-2* се характеризира с висока степен на трансмисивност и риск от развитие на пандемия. *COVID-19* инфекцията варира от асимптоматични или леки клинични форми със засягане на горните дихателни пътища до умерени и тежки прояви с дихателна недостатъчност, остър респираторен дистрес синдром и мултиорганна недостатъчност с летален изход [5].

Липсата на специфично медикаментозно лечение за *SARS-CoV-2* и бързото му разпространение, налага ваксиниране 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. В последствие започна прилагането и на бустерни дози с цел повишаване на ефективността към различните мутации на вируса [6].

Оформиха се няколко групи индивиди с хуморален имунитет, в зависимост от начина на придобиването му. При едни – естествено придобит, при други – ваксинационен, а при трети – хибриден. Под хибриден имунитет се определя такъв, придобит от боледуване и ваксинация без значение от реда на поява на събитията [7].

## II. ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР

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 е специфичен – той е насочен към определен вид антиген и включва клетъчни и хуморални фактори. Хуморалният имуноен отговор се осъществява чрез производството на имуноглобулини (антитела) от В – лимфоцитите. В зависимост от антигена, към който е насочен, се различава антибактериален, антитоксичен и антивирусен имунитет [8].

### II.1. Структура на антителата

Антителата са хетеродимерни структури изградени от две леки и две тежки полипептидни вериги. Леките вериги могат да бъдат  $\kappa$  или  $\lambda$  тип. Тежките вериги биват пет типа и в зависимост от вида им имуноглобулините се разделят на подкласове – IgM ( $\mu$  – вериги), IgG ( $\gamma$ -вериги), IgA ( $\alpha$ -вериги), IgE ( $\epsilon$ -вериги) и IgD ( $\delta$  -вериги). Тежките и леките вериги са свързани чрез дисулфидни мостове и нековалентни връзки. Всяка верига е изградена от няколко домейна (2 за леките вериги и 4-5 за тежките) от по 110-120 аминокиселинни остатъка. В N-края на молекулата последователността на аминокиселините е различна и затова той се обозначава като вариабилен район. Обратно C – края се характеризира с относително постоянство на аминокиселинния състав и затова се нарича константен район. Под действието на папаин молекулата на имуноглобулина се разцепва на два фрагмента. Fab – регионът е антиген-свързващото място, а Fc регионът осъществява ефекторните функции. Под действието на пепсин имуноглобулинът се разцепва на два еднакви F(ab') фрагмента. Те нямат ефекторни свойства поради отсъствието на Fc региона.

IgG са 70-80% от серумните имуноглобулини с време на полуживот около 23 дни. Това е единствения изотип, който преминава през плацентата и в кърмата. Има четири подкласа на  $\gamma$  – веригата и съответно IgG бива IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgG1 и IgG3 могат да фиксират комплемента и са насочени по-специално към белтъчни антигени. IgG2 е насочен към полизахаридни

антигени и слабо фиксира комплемента. IgG4 е насочен в защитата срещу хелминти и няма способността да фиксира комплемента.

IgM е имуноглобулинът с най-голяма молекулна маса и затова е ограничен само в интраваскуларното пространство. Има силно изразени аглутиниращи и комплемент-активиращи свойства. Молекулата на IgM има 10 валентности, но по стереохимични причини може да свързва до пет епитопа.

IgA се установява в серума и в лигавиците на горните и долните части на респираторния тракт и гастроинтестиналния тракт. Може да съществува в мономерна форма – най-често в серума и димерна, която се установява в секретите.

IgE – имуноглобулин с кратък полуживот, чиято основна функция е да свързва мастоцитите. Участва в реакциите на анафилаксия и други алергични реакции. Заедно с IgA има роля в локалния имунитет срещу паразитни и бактериални инфекции.

IgD – локализира се предимно в интраваскуларното пространство и участва в диференциацията и съзряването на клетките –предшественици на зрелите В-лимфоцити [9,10].

## **II.2. Синтез на антителата**

Първата стъпка в синтеза на антителата се осъществява от про-В-клетките в костния мозък, чрез реорганизиране на  $\mu$  тежката верига. За целта се сближават четири генни сегмента. Първо D – сегментът се добавя към J – сегмента посредством сплайсинг и след това към тях се свързва V – сегмента. Поради голямата вероятност от грешки е необходимо клетката да „провери“ функционалността на получения продукт. За тази цел В-клетката свързва  $\mu$  веригата със сурогатна лека верига. Ако се установи добра реактивност, другият алел в хромозомата преминава алелна ексклузия и по този начин той не може да бъде допълнително реорганизиран. Ако  $\mu$  веригата не се експресира правилно настъпва реорганизация в другия алел за тежката верига.

При успешната реорганизация на тежката верига про-В-клетката започва да синтезира леката верига и се превръща в пре –В- клетка. Начинът

на реорганизация е почти същия, с тази разлика, че за леката верига няма D сегмент. След образуване на функционално активен IgM пре-B клетката се разделя давайки клонове от незрели B клетки. Ако настъпи взаимодействие между B-клетката и някои от антигените в костния мозък този клон бива унищожен поради вероятността от настъпване на автоимунна реакция.

Напускайки костния мозък, B-клетките експресират на повърхността си IgM и IgD. От този момент дори и да настъпи реакция към автоантиген това няма да доведе до унищожаване на клона. След като преминат в останалите лимфни тъкани, B-клетките имат около седем дни за да „открият“ своя антиген. Ако такова взаимодействие не настъпи, те биват унищожени. Ако бъдат стимулирани B-лимфоцитите, експресиращи IgM, преминават в герминативните центрове на вторичните лимфоидни органи и превключват към производство на друг подклас имуноглобулини. В този процес активно участие взимат CD4+ клетките чрез техния CD40 лиганд [11, 12].

При постъпване на антиген организмът започва да продуцира антитела, които могат да бъдат засечени около петия ден. Първичният антителен отговор се осъществява от IgM антителата, след това B-клетките превключват към производство на останалите изотипове. IgG започват да се синтезират на втората-третата седмица от началото на инфекцията. При вторично постъпване на същия антиген паметовите B-клетки започват да продуцират антитела още на първи-втори ден, като характерно е по-ниското количество на IgM на фона на по-високи количества IgG, IgA и IgE [13].

### **II.3. Функции на антителата**

Антителата имат пет основни ефекторни функции – неутрализиране, опсонизация, аглутинация, свързване на комплемента и антицяло-зависима клетъчна цитотоксичност.

Неутрализиране – една от основните функции е да блокират навлизането на патогена в клетката – гостоприемник. Това се осъществява чрез свързване на антицялото към специфично място на антигена, посредством което той взаимодейства с повърхността на клетката. Антицяло-зависимата неутрализиция включва антиген-свързващото място на

имуноглобулина. Неутрализираща функция имат антителата от всеки клас, но се среща най-често при IgG и IgA.

Опсонизация – процес на покриване на антигена с антитела и молекули от системата на комплемента с цел улесняване на фагоцитозата от неутрофили, моноцити и макрофаги (фагоцити). Тази функция е присъща за IgG, за които фагоцитите имат специфични рецептори (Fc $\gamma$ R) за Fc – фрагмента.

Свързване на комплемента - IgG и IgM имат свързващи места за C1q – първия протеин от каскадата. За да бъде активиран е необходимо той да се свърже с поне две свързващи места. Съответно една молекула IgM е достатъчна за активацията поради пентамерната си структура, а от IgG са необходими две молекули. За да стане свързващото място достъпно е необходимо взаимодействие между антитялото и антигена. Това обяснява факта, че комплемента не може да бъде активиран от свободно циркулиращите антитела.

Антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност – IgG се свързват с Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII по мембраната на моноцити и NK клетки и по този начин им представят патогените, които трябва да бъдат убити. Унищожаването се осъществява под действие на перфорини, гранзими и свободни радикали. Този механизъм се използва за клетки, които са прекалено големи, за да бъдат убити, например туморните клетки.

Аглутинация – процес на образуване на комплекси между антигените и антителата. По този начин се ограничава разпространението на патогените в организма. По-големите комплекси е много по-вероятно да бъдат фагоцитирани [14, 15].

#### **II.4. Роля на антителата при вирусни инфекции**

За своето размножаване вирусите използват клетката гостоприемник и затова те са интрацелуларни патогени. Действието на антителата е насочено към вируса или към инфектираната вече клетка. Основните механизми могат да се разделят на две основни групи – неутрализиращи и ненеутрализиращи. Неутрализацията на вируса може да се осъществи по няколко начина –

взаимодействие с повърхностните протеини на вируса, вътреклетъчна неутрализация чрез рН-зависима инхибиция и агрегация на вируса [16]. Вирусите могат да бъдат обвити или не и в зависимост от това навлизането в клетката се осъществява по различни механизми. Обвитите вируси взаимодействат с рецептори по повърхността на клетката - гостоприемник чрез специфични епитопи от обвивката и при тях неутрализацията включва свързване с тези епитопи или промяна на самата обвивка. Вирусите, които нямат обвивка навлизат чрез лизиране на клетъчната мембрана или образуване на пори в нея. Ако неутрализацията не бъде осъществена успешно, в клетката навлиза вирусът и свързаното с него антияло посредством ендоцитоза, чрез взаимодействие с FcR или друг рецептор за антиялото. По този начин инфекцията не само не се блокира, а напротив може да бъде стимулирана от хуморалния имунитет. Индукция на вирус-неутрализиращи антитела е търсен ефект при разработката на ваксини и това им свойство може да се използва при терапия с моноклонални антитела [16, 17].

В процеса на неутрализация на вируса антителата често взаимодействат със системата на комплемента. Механизмите по които блокират инфекцията включват взаимодействие с обвивката на вируса (ако има такава), комплемент-зависими лиза или агрегация или индукция на взаимодействие с други ефекторни клетки на имунната система на организма. Относно вече инфектираните клетки комбинацията на антитела и комплемент може да осъществи блокиране на узряването и освобождаването на вирусни частици или директно унищожаване на клетката посредством комплемент-зависимо лизиране. Агрегацията сама по себе си не води до активна неутрализация, но намалявайки вирусния товар спомага действието на останалите механизми [18, 19].

Неутрализиращите функции на антителата са насочени предимно към инфектираната вече клетка и включват антияло-зависима цитотоксичност, антияло-зависима фагоцитоза и агрегация на вируса [16].

### **III. КОРОНАВИРУСИ**

Патогенните за човека коронавируси принадлежат към семейство Coronaviridae и са едноврижни РНК вируси, които имат обвивка със специфична структура. Те са най-големите вируси с геном около 30-32 кВ.

Семейство Coronaviridae се разделя на две подсемейства – Coronavirinae и Torovirinae. Подсемейство Coronavirinae включва няколко рода – AlphaCoV, BetaCoV, GammaCoV, DeltaCoV. Коронавирусите причиняват гастроинтестинални, респираторни и системни инфекции при много гръбначни животни. Познати са девет патогенни за човека вида, като седем от тях са идентифицирани от началото на двадесети век и от години са суспектни като причинители на пандемия. При хората коронавирусаите причиняват основно инфекции на дихателната система и по-рядко гастроентерити. В зависимост от тежестта на причиняваното от тях заболяване се разделят на слабопатогенни и високопатогенни. Слабопатогенните инфектират горната част на респираторната система и причиняват леко до средно тежко заболяване, най-често с грипоподобна симптоматика. Видове с висок патогенен потенциал са причинителите на Severe acute respiratory syndrome-CoV (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome – CoV (MERS-Cov) и SARS-Cov-2, които инфектират долните отдели на дихателната система и могат да доведат до тежко увреждане на белодробния паренхим, дихателна недостатъчност и смърт.

SARS-CoV възниква като епидемия през 2002 година в провинция Гуангдонг, Китай. Тя засяга над 8400 човека със смъртност от около 9,6%. Вирусът на SARS-CoV навлиза в клетката, взаимодействайки с ACE – рецепторите, разположени по повърхността на клетките в дихателната система и гастроинтестиналния тракт. MERS-CoV възниква през 2012 год. в района на Саудитска Арабия, засяга 1936 човека със смъртност от около 36%. MERS-CoV навлиза в клетката, взаимодействайки с рецептора дипептидилпептидаза 4 (DPP4) [20, 21, 22].

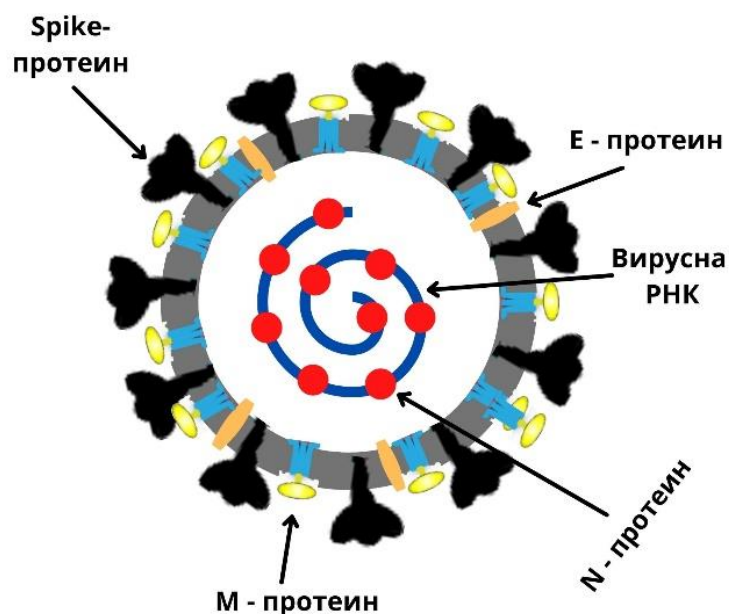
SARS-CoV-2 се появява за първи път през 2019 година в провинция Ухан, Китай, предизвиквайки пандемия, разпространена в над 200 държави. Към ноември 2021год. тя е засегнала над 260 милиона човека, причинявайки смъртта на над пет милиона от тях. Основните аспекти на патогенезата на заболяванията, причинени от тези коронавируси включват цитопатичния ефект и реакцията на имунната система, която освен протективна може да бъде и патологична. Едно от доказателствата за възможния имунопатологичен ефект на инфекцията е наблюдението, че заболяването

може да увеличи своята тежест дори и при намаляване на вирусната репликация [23, 24].

#### IV. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА SARS-COV-2

##### IV.1. Структура на SARS-CoV-2

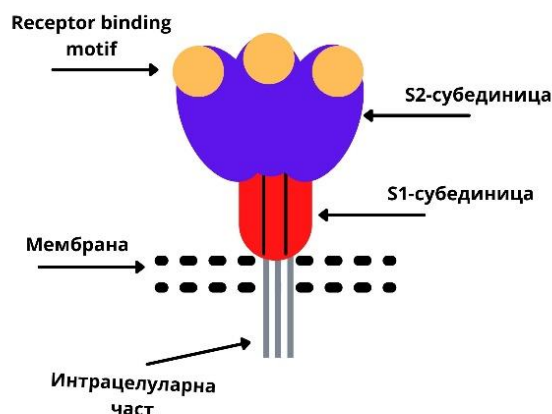
Вирусът на SARS-CoV-2, както останалите коронавируси се състои от едноверижна РНК, като при него молекулната маса на РНК е 29.9 кВ и специфична обвивка [25]. Гените кодират транскрипцията на 16 неструктурни протеина, които се обозначават като nsr1-16 и четири структурни протеина. Неструктурните протеини участват в различни реакции на взаимодействие между вируса и клетката – гостоприемник, репликацията, трансляцията и транскрипцията на вируса. Структурните протеини са 4 вида – N (Nucleocapsid), S (spike), M (membrane) и E (envelope) (фигура 1).



Фигура 1: Схематично представяне на структурата на SARS-CoV-2

S – spike протеините са 15-30 свободно ротиращи се трансмембранни протеина с три региона – къса интрацелуларна част, трансмембранен регион и ектодомейн, който се състои от две субединици – S1 и S2 (фигура 2). S1 субединицата се състои от два домейна – N-терминален домейн (NTD) и RBD (receptor binding domain). Чрез RBD, вирусът се свързва с ACE2 – рецептора по повърхността на клетката – гостоприемник. RBD също е изграден от два домейна – централен (коров) и външен домейн. Коровият се състои от пет  $\beta$  – вериги, подредени антипаралелно и свързани с къси вериги и дисулфидни връзки. Този домейн се характеризира с консервативност и постоянство на аминокиселинния състав. Между  $\beta 4$  и  $\beta 7$  се разполага RBM (receptor binding motif) и това е основното място, където се осъществява връзката между SARS-CoV-2 и ACE2 рецептора. Установено е, че тези връзки се случват с по-голям афинитет при SARS-CoV-2 в сравнение със SARS-CoV [26, 27, 28].

Основната функция на S2 субединицата е да усилва взаимодействието между вируса и клетката. Състои се от няколко части – FP (fusion peptide), HR1 (heptad repeat 1), HR2 (heptad repeat 2), CD (connector domain), TM (transmembranic domain) и CT (cytoplasmic tail). HR1 и HR2 образуват шесткомпонентен спираловиден сноп с по 3 домейна от всеки вид. Тези структури са почти еднакви при SARS-CoV и SARS-CoV-2, но при SARS-CoV-2 връзката между тях е по-устойчива. Това може и да е една от причините за по-силните инфекциозни способности на причинителя на COVID-19 [26].



Фигура 2: Схематично представяне на структурата на Spike-протеина

Модифицирано от : Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK et al. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. PLoS Pathog, 2020, 16(8)

Е – протеинът е малък полипептид, на който N-краят е хидрофобен и се разполага трансмембранно, а С – крайт се намира в цитоплазмата. Той има някои много важни функции като йонен транспорт - образуване на виропорини и транспорт на вирусни частици и е една от най-консервативните части на коронавирусите [29].

М – протеинът се състои от три трансмембранни домейна, като един от тях е амфипатичен и показва висока консервативност в семейство Coronaviridae, докато останалите домейни са силно вариабилни. М – протеинът взема участие в сглобяването на вирусните частици чрез взаимодействие с РНК и индуциране на връзките между различните протеини. Той има роля и в патогенезата на заболяването като се свързва с NF-κB и намалява производството на циклооксигеназа 2 [30, 31].

N – протеинът свързва геномната РНК и има основно функции в репликацията и транскрипцията, както и в оформянето на рибонуклеопротеиновия комплекс. Ролята му в патогенезата на инфекцията

включва взаимодействие с клетката - гостоприемник като в някои случаи може да индуцира нейната апоптоза. Структурата на N-протеина включва три основни домейна – NTD (N-рамо), CTD (C - опашка) и CL (централна свързваща част). NTD свързва РНК. CTD има роля в олигомеризацията на N-протеина и взаимодействието между M и N протеините, а CL има специфично участие във връзката с M-протеина [32].

#### **IV.2. SARS-CoV-2 основни варианти**

По време на вирусната репликация могат да настъпят различни мутации в генома на вируса, които да доведат до промени в свързването му с рецептора и навлизането в клетката, както и различна ефективност на вече изградените от организма антитела [33]. Новите варианти могат да изчезнат спонтанно или да останат и да се разпространят, замествайки старите такива. Те биват класифицирани от CDC (Centers for Disease Control and Prevention) в няколко категории като в момента попадат в две от тях – варианти, които се мониторират и обезпокоителни варианти. Обезпокоителни варианти са тези при които има данни за по-лесно разпространение, промяна в клиничната картина, затруднена диагностика, по-трудно лечение и намалена ефективност на антителата, придобити след преболедуване или ваксинация. Към януари 2022 година в тази категория спадат Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). Вариантите, които се мониторират имат подобна характеристика, но тяхната циркулация в популацията е понижена или липсва. Такива към същата дата са например Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) и Epsilon (B.1.427, B.1.429), които в отделни периоди от пандемията са попадали и в групата на обезпокоителни варианти [34].

Още в ранните етапи на пандемията е засечена мутацията D614G, която води до заместване на аспартанова киселина с глицин на 614-та позиция в Spike протеина. Тази мутация се среща във всички варианти до момента и води до повишена инфекциозна способност, но данните за това дали причинява по-тежко протичане на заболяването са разнопосочни [35]. През септември 2020г. в Англия е засечен вариантът B.1.1.7, наречен Alfa, който има 17 мутации, 8 от които, намиращи се на участъци в шипчестия протеин, с които той взаимодейства с ACE2-рецептора. Това повишава неговите възможности за навлизане в клетката и съответно води до по-голяма

инфекциозност и по-бързо разпространение. Така до декември 2020г. 75% от секвенираните проби в Англия принадлежат към тази генетична линия. Въпреки промените, ваксините показват висока ефективност спрямо този вариант и процентът на редукция на симптоматичните инфекции, хоспитализацията и смъртността е почти сходен с този към оригиналния вариант [35, 36]. Един месец по-късно, през октомври 2020г. в Южна Африка е идентифицирана линията B.1.351, означена като Beta. При нея се наблюдават множество мутации, като девет от тях са установени в RBD на S-протеина [36]. В края на 2020г. в Индия е засечен нова генетична линия – B.1.617, към която спадат три подлинии: B.1.617.1, B.1.617.2 (Delta) и B.1.617.3. Поради своята по-голяма контагиозност и възможностите за избягване на имунната защита на организма, Delta-вариантът се разпространява бързо и до края на 2021г. е най-често изолирания при геномно секвениране в по-голямата част от света. Неговите характеристики са резултат от мутации, осем от които в Spike-протеина, като 2 са разположени в RBD и 1 във т.нар. furin-cleavage site [34, 36]. Вариантът Omicron (B.1.1.529) е докладван за първи път в Южна Африка на 24.11.2021 г. Той има 32 мутации на S-протеина, 15 от които на RBD, което го прави обезпокоителен, поради възможността от избягване на придобития хуморален имунитет. Някои от тези мутации са положителни, т.е. те усилват свързването на вируса с неутрализиращите антитела, докато други са отрицателни. Изследванията до момента показват по-голяма тежест на отрицателните мутации и по-голяма вероятност за понижена ефективност на имунния отговор вследствие както на преболедуване, така и на ваксинация [37].

### **IV.3. Размножаване на вируса на SARS-CoV-2 и патогенеза**

Входна врата за вируса е най-често лигавицата на горните дихателни пътища. Вирусът инфектира клетката чрез свързване на RBD на S1 субединицата на Spike – протеина с ACE рецепторите по повърхността [9]. Това взаимодействие се потенцира и от други молекули: TMPRSS2 (transmembrane serine protease) и CTSB и CTSL (cathepsin B и L) – ендозомални/лизозомални цистеин протеази [38]. SARS-CoV-2 има необичайна за коронавирусите област – т.нар. furin cleaved site и затова може да взаимодейства с рецептор NRP-1 (neuropilin-1), който спомага за

разпространението на вируса в централната нервна система. Друг рецептор, за който се смята, че спомага за това разпространение е CD147, който се среща с голяма честота по клетките на главния мозък [39]. След свързване с рецепторите и разцепване на шипчестия протеин посредством мембранните протеази, геномната РНК, освободена от обвивката, навлиза в клетката-гостоприемник. Там преминава процес на транслация, при който се получават два полипротеина – pp1a и pp1ab и се свързват с репликационно-транскрипционни комплекси заедно с мембранни везикули. Следва синтез на субгеномна РНК, която кодира структурните и неструктурните протеини, сглобяване на вирусните частици и освобождаването им в екстрацелуларното пространство [39].

Факторите на взаимодействие – ACE2 и TMPRSS2 се срещат с голяма честота по повърхността на клетките на дихателната система. ACE2 е един от основните компоненти на ренин-ангиотензин-алдостероновата система, която отговаря за хомеостазата на течностите и електролитите в организма и поддържане на кръвното налягане. ACE2 е основен регулатор на продукцията на ангиотензин II. Когато този протеин бъде блокиран от вируса, се увеличава количеството на ангиотензин II, който може да има фиброзиращ и тромботичен ефект.

Осъществявайки цикъла си на размножаване вирусът постепенно преминава от ендотелните клетки на горните отдели на дихателния тракт към алвеолите и причинява увеличен пермеабилитет на съдовете. От това следва оток, хипоксемия и исхемия, дихателна недостатъчност и увреждане на белодробния паренхим. От клетките на респираторния тракт вирусът навлиза в кръвообръщението, състояние наречено виремия, и достига до различни органи и тъкани в организма. Виремия се среща и при пациенти със средно тежки симптоми и откриването на вируса в кръвта може да бъде прогностично за хода на инфекцията.

ACE2 и TMPRSS2 се откриват в клетките на гастроинтестиналния тракт и затова при болните често се срещат симптоми като диария и увеличени нива на чернодробните аминотрансферази. Засягането на централната нервна система се осъществява отново чрез взаимодействие с ACE2 и TMPRSS2, които се намират по повърхността на глиалните клетки, невроните,

ендотелните клетки и клетките на гладката мускулатура на артериолите и действието на допълнителните рецептори – CD147 и NRP11. Най-честите прояви от страна на ЦНС са главоболие, световъртеж, хипосмия или дизосмия и хипогеузия.

Клетките на сърцето и бъбреците също експресират фактори на взаимодействие и затова, макар и по-рядко, също могат да бъдат засегнати в хода на инфекцията. ACE2 и TMPRSS2 се експресират с висока честота в хода на някои хронични заболявания като диабет, хипертония, метаболитни нарушения, хронични белодробни болести, което е най-вероятната причина за по-тежкото протичане на инфекцията при тези пациенти [40, 41].

Острият период на заболяването протича в две основни фази – първата фаза е резултат от репликацията и разпространението на вируса, а втората фаза е резултат от действието на имунната система на организма, която освен защитна функция може да допринесе и за по-тежкото протичане на инфекцията [41].

## **V. ИМУНЕН ОТГОВОР КЪМ SARS-COV-2**

### **V.1. Механизми на естествен имунитет срещу SARS-CoV-2**

Вирусът предизвиква реакция на имунната система, чрез разпознаване на специфични молекули – PAMP (pathogen associated molecular patterns) от т.нар PRRs (pattern recognition receptors) като TLR (Toll like receptors) – 3,7,9 , RIG-I (retionid acid inducible gene - I) , MDA5 (melanoma-differentiation associated gene 5) и NLR1 (nod-like receptors 1). След свързването с рецепторите се отключва каскада от реакции, която води до активация на транскрипционни фактори – IRF (interferon regulatory factor) и NF-κB и до продукцията на цитокини като IFN -1 и IFN -3, TNF-α (Tumor necrosis factor - α), интерлевкин 1, интерлевкин 6 и др. Тези цитокини оказват антивирусен ефект или чрез директна активация на антивирусната защита на клетката или чрез индукцията на механизмите на придобит имунитет. Посредством неструктурните си протеини, SARS-CoV-2 може да прояви резистентност към факторите на естествения имунитет, като например блокиране производството на IFN-1.

IFN-1 е много важен за първоначалната антивирусна защита и фактът, че се открива в по-малко количество при инфекцията със SARS-CoV-2 е в основата на по-бързото размножаване на вируса и по-голямо увреждане на тъканите. При разрушаването на клетките се освобождават вещества, които привличат компоненти на имунната система към мястото на възпаление и предизвикват отделяне на цитокини. Цитокиновият профил на пациентите включва увеличени нива на IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF (granulocyte – colony stimulating factor), IP-10 (interferon- $\gamma$  inducible protein 10), MCP1, MCP3 (macrophage chemoattractant protein 1,3 ) и други [42, 43, 44]. Едновременното повишаване на нивата на IP-10 и MCP-1 е показател за тежко протичане на заболяването [45]. Освен увреждане на белодробния паренхим, т.нар. „цитокинова буря“ може да стимулира вiremията и да доведе до шок и полиорганна недостатъчност [46].

Вроденият имуен отговор включва също и действието на **комплемента**, който както останалите фактори на имунитета, може да допринесе за елиминиране на инфекцията, но също и за допълнително увреждане на тъканите. Механизмите за активация и ефектите от действието са по-добре проучени при SARS-CoV и MERS-CoV, докато за SARS-CoV-2 все още се очакват резултати от проучванията. SARS-CoV може да активира комплемента по лектин-зависимия път, чрез взаимодействие с MBL (mannose – binding lectin), който активира MASP-2 (mannose – binding protein associated protease - 2), водещо до увеличена продукция на C4 протеина от системата [47]. Освен това нуклеокапсидът може директно да взаимодейства с протеина MAP19 (алтернативен продукт от сплайсинга на MASP-2) и да индуцира Ca-зависимата автоактивация на MASP-2, което води до бърза и неконтролирана комплементна каскада. Класическият път също може да бъде използван, което се осъществява чрез активиране на C1 от комплексите антиген – антитяло [48]. Повечето проучвания посочват по-често увреждащото действие на комплементната система. В проучвания при мишки е установено, че дефицитът на C3 води до по-леко протичане на инфекцията, причинена от SARS-CoV [49]. Проучване на пет пациенти с тежко протичане на COVID-19 показва връзка между активацията на комплемента и вероятността от тромбози и микросъдови увреждания [50]. По-високи нива

на С5а се свързват с по-изразена тежест на заболяването, както и присъствие на голямо количество комплементни молекули в алвеолите и пневмоцитите са докладвани от Gao и колектив [48].

**NK (Natural Killer) клетките** са друг важен елемент във вродения имунен отговор и могат да оказват директно цитотоксично действие, да секретират цитокини и да участват в реакции на антияло-зависима клетъчно медирана цитотоксичност. В ранната фаза на SARS-CoV-2 инфекция NK клетките са способни да разпознават инфектирани клетки, което води до повишаване експресията на активационни рецептори като NKG2D наред с понижаване експресията на инхибиторни рецептори като NKG2A [51]. Пептиди, получени от неструктурния протеин на вируса Nsp13 може да образуват комплекси с HLA-E молекули и по този начин да се блокира свързването на лиганди с инхибиторния рецептор NKG2A [52]. В някои случаи това води до свръхактивиране на NK клетките, водещо до нарушаване функцията им, което е показано в резултатите от няколко проучвания, проведени при пациенти с тежко протичащ COVID-19 [53, 54]. Някои автори посочват и понижаване броя на NK клетките в периферна кръв при тези пациенти и по време на острата фаза на заболяването. Понижаването броя на NK клетките може да бъде използвано и като диагностичен и предиктивен маркер за развитието на инфекцията [55].

## **V.2. Механизми на придобит имунитет срещу SARS-CoV-2**

Механизмите на придобит имунитет, както и при другите вируси, включват хуморални и клетъчни фактори. Те действат както самостоятелно, така и в комбинация и са свързани помежду си чрез различни взаимодействия.

### **V.2.1. Клетъчен имунитет**

При болни от COVID-19 се установява 70% серопозитивност на CD8+ Т клетките и 100% позитивност на CD4+ Т клетките, което доказва ролята на клетъчно-медирания имунитет в защитата срещу вируса [56]. CD4+ Т клетките могат да бъдат засечени от около 2-4 ден от началото на инфекцията и биват най-често Th1 и Tfh (helper T-follicular cells). Налични са и

данни за индукция на Th17 клетки и се открива положителна корелация между количеството им и тежестта на протичане на заболяването [57]. CD4+ Т клетките са насочени основно към S,M,N – протеините, но в конвалесцентната фаза могат да се открият и такива срещу някои неструктурни протеини, като nsp3, nsp4 [56, 58]. Функциите на тези клетки се изразяват в активация на В-лимфоцитите за продукция на вируснеутрализиращи антитела, спомагане действието на CD8+ Т клетките, директно антивирусно действие и спомагане за възстановяването на увредените тъкани. Продуцираните от тях цитокини включват IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-21, IL-22, IL-17 $\alpha$  [58].

Поради директното си цитотоксично действие, насочено към заразените клетки, CD8+ Т клетките имат важна роля в имунната защита срещу вируси. Тези клетки също могат да бъдат установени рано в хода на инфекцията, понякога още на първия ден от появата на симптомите. Техният субстратен профил също включва S, M, N – протеините и много от неструктурните протеини. Цитотоксичното им действие се осъществява посредством IFN- $\gamma$ , гранзими, перфорини и CD107a [59]. В хода на инфекцията, особено при пациенти с тежко протичане на заболяването, се наблюдават CD8+ Т клетки експресиращи маркери на изтощаване като PD1 и TIM-3 (T- cell immunoglobulin mucin - 3) [60] .

Характерна находка при изследване на периферна кръв е лимфопения с намаляване броя най-вече на CD4+ и CD8+ Т лимфоцитите или увеличено съотношение CD4+/CD8+ [61]. Проследяване броя и съотношението може да бъде от полза за прогнозиране хода на инфекцията [62].

Стимулиране на клетъчен имунен отговор се наблюдава и след ваксинация, което е установено в проучване, проследяващо нивата на IFN- $\gamma$  при индивидите, при които е приложена иРНК ваксина [63].

### **V.2.2. Хуморален имунитет**

Функция на В-клетките е в производството на специфични **антитела**. Те са насочени основно срещу S-протеина и неговия RBD и срещу нуклеокапсида. От тях с най-голямо значение за защитата на организма са

вируснеутрализиращите антитела. Антителата освен протективна функция могат да спомогнат за вирусната инфекция по механизма на антитяло – зависимото усилване. Когато вирусът се свърже с антитела, които не са или са слабо неутрализиращи, това може да подпомогне, вместо да блокира навлизането му в клетката. Има данни за такъв тип взаимодействие, с най-голяма честота при MERS, но също и при SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 [64, 46].

В проучване на 26 пациенти е установено едновременно наличие на IgG антитела и вируса на SARS-CoV-2 до 47 дена. Това показва, че антителата сами по себе си не са достатъчни за изчистване на организма от вируса, те по-скоро биха били ефективни, възпрепятствайки навлизането на вируса в клетката [65].

При изследване на 41 проби взети в рамките на 1-7 дни от първата проява на симптомите, 35 от тях са били положителни за IgM, т.е. 85,4% и 38 са били положителни за IgA (92,7%). При изследване на 208 проби взети в рамките на 10-18 дни от началото на инфекцията, 162 (77,9%) са били положителни за IgG с време на появяване средно на около 14-тия ден [66].

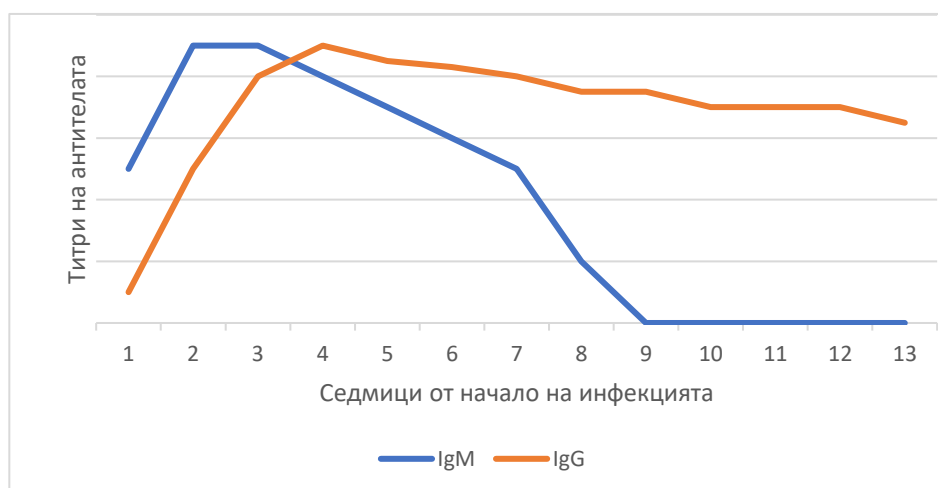
В проучване, което проследява 112 пациенти в рамките на 80 дена, веднъж на две седмици, се установяване покачване нивата на IgM насочени срещу нуклеокапсида до около втората седмица от началото, след което те започват да намаляват и серопозитивност спрямо анти-NP IgM се установява до около 4-6 седмица. IgM срещу RBD на S-протеинът се появяват по-късно и достигат пикови стойности около трета – четвърта седмица [67].

В друго изследване са наблюдавани 192 хоспитализирани пациенти. При тях сероконверсията на IgM настъпва на 5 – 10 ден с пикови стойности на 2 – 3 седмица и негативни след осма седмица. Относно IgG сероконверсията настъпва обикновено по-късно, но понякога и заедно с тази на IgM, пиковите стойности са на около 3-4 седмица, а след осма седмица те са положителни при около 90% от пациентите [68].

В едно по-голямо проучване, обхващащо 1850 пациенти, публикувано в Nature, се установяват следните проценти в зависимост от началото на симптомите. През първата седмица серопозитивност за IgM имат 32,5%, а за

IgG 62,5%. През втората седмица 97,4% имат и двата вида антитела. След като достигне пиковите си стойности на около 3-4 седмица, IgM постепенно намалява и след осмата седмица почти не се засича в серумите, докато IgG остават положителни в 97,6% от пациентите след 12-тата седмица [69].

На фона на тези и други публикации може да се заключи следната динамика на антителата в острата фаза от развитието на инфекцията (фигура 3). Тя е сходна с тази при други вирусни инфекции. Покачване нивата на IgM като сероконверсия се наблюдава от 1-7 ден, с достигане на пикови стойности на 2-3 седмица, след това постепенно намаляване и до 50-60 ден, в повечето случаи пациентите са отрицателни за тези антитела. Сероконверсия в IgG се наблюдава обикновено след 7-14 дни, но не е изключено и по-рано, едновременно с тази на IgM. Пиковите стойности се наблюдават на около 3 – 4 седмица, след това постепенно намаляват, достигайки плато, в което се задържат за различни периоди от време. В края на острата фаза на заболяването пациентите са серопозитивни за IgG в почти 100% от случаите. Тези данни могат да се използват за проследяване хода на инфекцията. Освен другите методи за детекция на SARS-CoV-2, показателни за такава са и наличието и стойностите на антителата от клас IgG и IgM и в зависимост от съотношението между тях може да се даде ориентировъчна оценка за давността на заболяването.



*Фигура 3: Динамика на антителата в хода на инфекцията и реконвалесцентния период. Графиката е построена въз основа на резултатите от някои проучвания, разгледаните в т. V.2.2. [65-69]*

**Вируснеутрализиращите антитела** могат да бъдат насочени срещу S-протеина или срещу нуклеокапсида. Въпреки, че е по-малък, нуклеокапсидът е силно имуногенен и в началото на инфекцията вируснеутрализиращите антитела са насочени предимно срещу него [70]. Антителата към компонентите на Spike протеина – S1, RBD, S2 започват да се изграждат около една седмица след началото на симптомите, достигайки пикови стойности на около 10-15 ден [71, 72]. Относно степента на серопозитивност спрямо тях, в проучване на 160 медицински работника с установена инфекция, се наблюдават следните стойности: между 13-20 ден от началото на симптомите 79% са серопозитивни, 91% са серопозитивни между 21-27 ден и 98% на 28-41 ден [73]. В няколко проучвания се посочва положителна връзка между титъра на антителата и тежестта на заболяването. Тази зависимост се наблюдава при изследване на 35 пациенти един месец след инфекцията [74] и при съпоставяне на 30 хоспитализирани и 25 асимптоматични пациенти, при което 56% от асимптоматичните са били серонегативни за анти-S вируснеутрализиращи антитела, 28% са имали ниски титри и само един пациент е показал високи стойности [75]. При изследване на 65 пациенти 94 дена след появата на първите симптоми, се наблюдава по-силен вируснеутрализиращ имунен отговор с по-високи пикови стойности на антителата, при по-тежко протичане, както и задържането им във времето. Установява се, че въпреки различията в магнитуда, динамиката остава една и съща. Авторите посочват, че степента на имунния отговор може да се използва като показател за хода на инфекцията [76]. Още един фактор е показан като определящ и това е възрастта на пациентите. В проучване на 175 пациенти, разделени в три категории: млади (18 г.-39 г.), на средна възраст (40 г.-59 г.) и възрастни (60 г.-85 г.) се установяват по-високи стойности на антителата при хората на средна възраст и възрастните. Също така се наблюдава положителна връзка с нивата на CRP и отрицателна връзка с броя на лимфоцитите [72]. В друго проучване обаче, което обхваща 11 хоспитализирани пациенти, не се открива зависимост между възрастта и вируснеутрализиращия имунен отговор [75].

### **V.3. Зависимост между хуморалния имунен отговор и тежестта на протичане на заболяването**

Редица изследвания посочват правопрпорционална връзка между нивата на IgG и IgM антителата и тежестта на заболяването по време на острата фаза на инфекцията и ранния реконвалесцентен период. Тази зависимост е показана и в проучването на Tap и колектив върху 67 пациенти с COVID-19 [77]. В същото изследване е показана по-ранна сероконверсия при по-тежко протичане на заболяването и по-бързо очистване на организма от вируса при пациентите с по-слаб имунен отговор. Такава зависимост е описана и при изследване на 175 хоспитализирани пациенти, 32 от които в тежко състояние [78]. Тук авторите посочват и възможността по-високите титри на антителата като корелация с по-тежкия ход на заболяването да са резултат от антицяло–медирано инфектиране на клетките. В друго проучване обаче, проведено при 88 пациенти, 32 от които в критично състояние, се наблюдава по-ранна сероконверсия и по-високи титри при средно тежко състояние, в сравнение с критично болните [79]. В това проучване вземането на проби е било само еднократно, без да е проследена динамиката във времето [79]. При проследяване динамиката на 285 пациенти, 39 от които в тежко състояние се установява, че по-силната сероконверсия се наблюдава при по-тежко протичане във времевия период от 7-14 дена от началото на заболяването, но между 15-21 ден такава разлика не се наблюдава [80]. IgM антителата не се установяват в 20% от асимптоматичните болни през първата седмица и при повечето те не позитивират в хода на инфекцията или се измерват в ниски количества. За сметка на това при тях пиковите стойности на IgG настъпват по-рано. Пресимптоматичните и симптоматичните имат по-високи стойности и при тях IgM се задържат за по-дълго време – в някои случаи за до 70 дена. Това се показва в изследване на 324 болни, от които 77 асимптоматични, 142 пресимптоматични и 105 симптоматични [81]. При сравняване на 37 пациенти без симптоми и 37 проявяващи симптоматика се установяват следните нива на сероконверсия: асимптоматичните са серопозитивни за IgM в 62,2%, а за IgG в 81,1% 3 – 4 седмици след експозиция. При симптоматичните IgM са положителни при 78,4%, а IgG при 83,3%. Отново се наблюдават по-високи титри при симптоматичните в острата

фаза на заболяването и ранния реконвалесцентен период. След това обаче понижаването е със 71,1% за безсимптомните и 77,2% за симптомните. След възстановяването 40% от асимптомните са серонегативни, за сметка на 12,9% от симптомните [82].

След анализа на тези проучвания може да се заключи, че степента на хуморален имунен отговор има отношение към тежестта на протичане на заболяването. Това се наблюдава основно в острата фаза и ранния реконвалесцентен период. По-високи титри със сигурност се наблюдават при симптоматични пациенти, сравнено с асимптоматичните, но между средно тежко и тежко болните данните са разнопосочни и не са достатъчни, за да се направи заключение. По-ниските антителни титри се свързват с по-ранно изчистване от вируса и съответно степента и динамиката на имунния отговор на фона на останалите лабораторни и клинични данни може да спомогне за прогнозиране развитието на болестта.

#### **V.4. Други фактори, повлияващи хуморалния имунен отговор**

В няколко проучвания се търси и корелация между хуморалния имунен отговор и възрастта на пациентите. В едно от тях се установяват по-малко антитела насочени срещу RBD в групата на възрастните пациенти, но при тях има по-силна имунна реакция насочена срещу нуклеокапсида [83]. Подобни данни са показани и проучването на Ои и колектив, което изследва 192 хоспитализирани пациенти и също показва по-високи титри на антителата към N-протеина с покачване на възрастта, но така също и на тези към RBD, макар и в по-малка степен. Също така в повечето от случаите тази разлика се наблюдава специално при IgG антителата, но не и при IgM [84, 85]. За педиатричната популация се установява следното: при тях водещ е клетъчният имунитет, но продукцията на IL-6 е по-ограничена, което обосновава добре насочения и контролиран имунен отговор. На около 2-ра – 3-та седмица се наблюдава и сероконверсия, като са налице и вируснеутрализиращи антитела. Особеностите на имунитета при педиатричните пациенти води до по-бързо очистване от вируса и съответно по-лекото протичане на заболяването при тях [86, 87].

Медикаментозното лечение на съпътстващите заболявания също би могло да даде отражение върху имунния отговор на пациентите. Така при изследване на 29 пациенти на имуносупресивна терапия в периода 2-35 дена от началото на заболяването 20 от тях са били серонегативни [88]. От тези 29 пациенти трима са имали подобен имунен отговор на контролната група, която не е лекувана с имуносупресивни средства. В същото проучване се изследват и 12 лица лекувани за HIV-1 и HIV-2 с антиретровирусни препарати и се установява, че 11 дена след началото на симптомите при девет от тях е налице сероконверсия. Извадката в това изследване обаче не е достатъчно голяма, за да се направи окончателна оценка на влиянието на тези лекарства върху имунния отговор срещу SARS-CoV-2 .

Полът също би могъл да има отражение върху реакцията на имунната система срещу вируса. В проучването на Zeng и колектив, обхващащо 331 пациенти, от които 127 мъже и 205 жени се установяват по-високи титри на IgG при жените в началото на инфекцията и 2-4 седмици след първоначалните симптоми. Един месец след началото динамиката на антителата при двата пола става една и съща. Разлики се наблюдават и в естествения и клетъчния имунитет. По-ниски нива на Т клетките са наблюдавани при мъжете на фона на по-силно производство на цитокини [89, 90]. Тези данни биха могли да дадат обяснение за по-тежкото протичане на COVID-19 при мъжкия пол.

#### **V.5. Продължителност на имунния отговор при първична инфекция**

COVID-19 съществува от няколко години, затова и все още не може да се даде точен отговор за продължителността на естествено придобития имунитет. Този въпрос е от изключителна важност, защото може да определи хода на пандемията, оценката на популационния и индивидуалния риск и необходимостта от ваксинация. Въпреки че показва различия, имунитетът към SARS-CoV , MERS-CoV и останалите сезонни коронавируси може да служи като ориентир и за този към SARS-CoV-2. При изследване на 176 пациенти, боледували от SARS-CoV за период от три години се открива понижаване на титрите на IgG антителата с 33% за първата година, 46% през втората и до 75% през третата година [91]. Друго проучване, направено в продължение на

две години при 56 човека, установява, че на 16-тия месец всички са серопозитивни, докато 11,8% са серонегативни на 24 месец [92]. В изследване на 9 пациенти, боледували от MERS-CoV, в продължение на една година се установява намаляване на титрите на антителата до 6-ти месец след началото на инфекцията, но задържането им в относителна стабилност между 6-12 месеца [93]. При изследване на други 9 пациенти серопозитивност се наблюдава за над 18 месеца, а в проучване на 6 пациенти за период от 34 месеца положителни стойности на антителата се наблюдават при пет от тях [94, 80]. При другите сезонни алфа и бета коронавируси продължителността на имунитета е по-малка, като при някои тя е около 12 седмици. В тези проучвания също се установява положителна връзка между тежестта на протичане на заболяването и магнитуда и продължителността на имунния отговор. И при SARS-CoV и при MERS-CoV по-дългосрочна серопозитивност се наблюдава при хоспитализирани пациенти, при които е имало данни за пневмония.

Проследяване продължителността на имунитета при SARS-CoV-2 се разглежда в редица проучвания, проведени за различни периоди от време и се наблюдават следните данни: след достигане на първоначалния пик, вируснеутрализиращите антитела и IgG навлизат в плато и постепенно намаляват. Процента на понижаване е по-голям при пациенти, които са имали по-силен имунен отговор, но въпреки това в периода 2 – 3 месеца след началото на заболяването при тях стойностите остават по-високи в сравнение с тези, при които той е бил по-слабо изразен. В проучванията отново се посочва връзката с тежестта на протичане на заболяването, особено изразена в ранните периоди след началото на инфекцията [95, 82, 96]. От значение е и дали антителата са насочени срещу S-протеина или срещу N- протеина. При изследване на IgM и IgG на 349 пациенти за 26 седмици от началото се установява следната динамика: IgM срещу нуклеокапсида се появяват по-рано в хода на инфекцията и се задържат за до 10-12 седмици, сравнено с около 5 седмици за тези към Spike протеина. IgG срещу N-протеина също се появяват по-рано, но за шест месеца стойностите и на двата вида се запазват във високи титри [95]. Анти-N-IgG се установяват в серума на 54 болни след 194 дена, като сравнено с ранния реконвалесцентен период спадането на титъра

е с около 46% и е малко повече когато антителата са били във високи титри [67]. Серопозитивност спрямо анти-S-IgG за период от 6 месеца се открива в още две проучвания проведени респективно върху 123 и 175 човека [97, 98]. В рамките на 6-12 месеца при 192 хоспитализирани и 58 амбулаторни пациенти се наблюдават положителни стойности на антителата при 100% от хоспитализираните и 95% от амбулаторните. Освен това отново по-високи стойности се установяват в групата на хоспитализираните и при хора на възраст 44-64 год., сравнено с млади пациенти от 18 до 43 години. Спадането титъра на IgG към нуклеокапсида в това проучване е по-бързо от това на антителата към шипчестия протеин [85].

Въпреки, че изследванията върху продължителността на имунитета към SARS-CoV-2 са ограничени, на този етап може да се предположи, че IgG и вируснеутрализиращи антитела срещу Spike протеина се задържат в плато и постепенно намаляват, но все още се установяват в по-голямата част от пациентите след 12 месеца. Антителата срещу нуклеокапсида също могат да бъдат засечени след шестия месец, но при тях кривата на спадане е по-стръмна. Въпреки, че в началото по-високи стойности се наблюдават при тежки форми на инфекцията и при по-възрастни пациенти, след шестия месец интензитетът и продължителността на серопозитивност се изравняват. Следователно, на базата на тях, не може да се определи каква ще бъде протекцията на тези пациенти от повторно заболяване и какъв ще е риска от повторно тежко развитие на заболяването.

## **V.6. Хуморален имунитет и ре-инфекция**

Относно вероятността за реинфекция на фона на серопозитивност се откриват няколко проучвания. Едно от тях проследява ситуацията в изолирано епидемично огнище на риболовен кораб със 122 човека [99]. Всички пътници са изследвани преди потеглянето и трима от тях са имали положителни стойности на вируснеутрализиращи антитела. От тези 122 човека в последствие 104 са били положителни за SARS-CoV-2, установени чрез RT-PCR тест. От тримата сероположителни нито един не е дал положителна проба за вируса, което показва протективното значение на вируснеутрализиращите антитела. В друго, по-голямо проучване се

проследяват 12 219 здравни работници, от които 11 364 серонегативни и 1 265 серопозитивни чрез редовно провеждане на RT-PCR тестове в период от около 200 дни [100]. От тези 11 364, които не са имали антитела в началото, 223 човека са били положителни за SARS-CoV-2, като от тях 100 не са имали симптоми при провеждане на RT-PCR изследването. От 1 265 серопозитивни работници, трима са установени положителни за РНК на вируса, като двама от тях са били асимптоматични и за един е имало данни за предишно боледуване. Това показва по-малка вероятност за инфекция в групата на серопозитивните. В проучването не са посочени обаче вида и количеството на антителата, както и данни за ваксинационния статус на персонала ]. При друго изследване се проследяват 2 867 работници в сферата на здравеопазването, като от тях 562-ма са имали положителни стойности на IgG срещу S-протеина и 92-ма са били слабо реактивни, като почти половината са имали и антитела срещу нуклеокапсида, което предполага предходно протичане на инфекцията [101]. В хода на 200-дневен анализ от 2 867 участника 285 (10,1%) са били позитивни при тестване с RT-PCR. При разглеждане случаите на инфекцията се констатира, че по-високите стойности на антителата се асоциират с по-нисък риск от заразяване. При разглеждане случаите на инфекция и допълнително изследване на Т-клетъчния имунитет се констатира, че по-високите стойности на антителата срещу шипчестия протеин и броя на Т клетките са свързани с по-нисък риск от заразяване.

#### **V.7. Кръстосана реактивност при коронавирусите**

Относно връзката между SARS-CoV и MERS-CoV е установена кръстосана реактивност между S1 и S протеините на SARS със S – протеина на MERS. Това предполага по-голяма консервативност на S2 субединицата на двата изследвани коронавируса [102]. В друго проучване се наблюдава липса на всякаква кръстосана реакция между RBD на SARS-CoV и MERS-CoV. Такава има между антителата срещу RBD на SARS-CoV и SARS-CoV-2, чиито геноми са сходни в над 74% [103], но при тях не се констатира вируснеутрализираща ефективност, което предполага тяхното различно имунологично въздействие [104]. При изучаване антителния отговор срещу RBD на SARS-CoV-2 и други ендемични коронавируси - HKU1, 229E, OC43,

NL63 отново не се откриват данни за кръстосан имунитет. При част от изследваните пациенти са установени антитела срещу някои от тези вируси, но не може да се определи дали те са резултат от кръстосване на имунния отговор с този към SARS-CoV-2 или са в следствие от наличие на клетки на паметта [105].

## **VI. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИТЕЛА КЪМ SARS-COV-2**

След установяване на SARS-CoV-2, още в началото на 2020 година започва разработка на различни методи за серологична диагностика. Те са от голямо значение, защото могат да послужат за епидемиологични проучвания на популационно ниво, които да покажат в известна степен, каква част от хората са се срещали с вируса, каква е динамиката и продължителността на хуморалния имунитет и също така, в комбинация с другите методи за детекция на вируса, могат да послужат за поставяне на диагноза.

За първоначална оценка на серопозитивността на пациентите може да се използват бързи тестове за установяване на IgG и IgM антитела, основани на имунохроматографския принцип, т.нар. LFIA (lateral-flow immunoassay). Като тяхно предимство може да се посочи това, че резултатът се получава в рамките на 15 минути, не се изисква допълнително оборудване и високо квалифициран персонал и може да се използва както периферна, така и капилярна кръв [106]. Изследват се антитела насочени както към нуклеокапсида, така и към Spike – протеина. Те обаче не могат да определят количеството антитела и все още не е установено над каква стойност резултатът се отчита като положителен. Плаката е съставена от два вида анти-човешки моноклонални антитела (анти-IgG и анти-IgM), получени от мишки, разположени на двете тестови линии и напръскани с конюгиран със златни наночастици антиген. Относно специфичността и чувствителността на метода е проведено изследване на 525 човека, от които 397 с положителен RT-PCR тест и 128 негативни в рамките на 8-33 дена от началото на инфекцията [106]. От 397 позитивни пациенти, при 352 са доказани антитела, което показва чувствителност от 88,66%, а от негативните 12 са имали положителен резултат, тоест специфичността в това изследване е била 90,63% . Друго проучване, което включва 12 хоспитализирани и 33

амбулаторни пациенти, доказани с RT-PCR тест, проведено 2-8 седмици от първата поява на симптомите, показва 92% серопозитивност при хоспитализираните и 79% при амбулаторните [107].

Лабораторното измерване на антителата се осъществява по някои от познатите към моменти методологии – ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), CLIA (Chemiluminescent immunoassay) и ELFA (Enzyme-linked fluorescence assay).

ELISA може да бъде използван за измерване на IgG и IgM срещу S – или N- протеина и IgA срещу S-протеина. За изследване на антителата срещу S-протеина плаките са покрити с рекомбинантни структурни S-частици. След добавяне на изследвания серум, инкубиране и промиване в зависимост от инструкциите на производителя, се добавят HRP (horseradish peroxidase)-конюгирани анти-човешки антитела, получени от мишки. При IgM срещу N-протеина има известна разлика, като плаките са покрити с античовешките антитела и след добавяне на серума, се накарва HRP, свързан с частици от N-протеина. HRP е ензимен конюгат, който води до промяна в цвета. След стопиране на реакцията се прави измерване в абсорбцията на светлината при 450 nm. Методът е количествен, крайната стойност се определя при изчисляване на съотношение (Ratio) в зависимост от калибратора при провежданото изследване. Интерпретацията се прави при следните референтни стойности: <0,8 – отрицателен резултат; 0,8-1,1 – гранична стойност и > 1,1 се отчита като положителен [108, 109, 110]. При изследване на 214 пациенти, средно 15 дни след началото на инфекцията се установява, че чувствителността е по-висока за IgM срещу S-протеина, сравнена с тази на IgM срещу нуклеокапсида. При IgG такава разлика в чувствителността не е установена [108]. ELISA може да бъде извършена както автоматично, чрез специална за това апаратура, така и мануално. В сравнение с останалите методи, този отнема най-много време – 2-3 часа, което може да бъде посочено като недостатък.

CLIA е хемилуминесцентен метод, който може да се използва за изследване на IgG и IgM срещу S– или N–протеина. Рекомбинантните антигени са конюгирани с FITC (fluorescein isothiocyanate) и са имобилизирани

върху магнитни частици, които съдържат анти-FITC антитела. Добавяните човешки IgG и IgM са конюгирани с алкална фосфатаза. Хемилуминесцентният сигнал се измерва със специална за това апаратура. В зависимост от производителя, крайното определяне на стойностите се осъществява чрез различни изчисления и се отразява в различни мерни единици. Методът е количествен. Резултатите могат да бъдат получени в рамките на 15-35 минути, което го прави подходящ за бърза серологична диагностика [109, 111, 112].

ELFA е имунофлуоресцентен метод, използван за детекция на IgG и IgM срещу Spike протеина. Основава се също на т.нар. „сандвичов“ принцип, като човешките имуноглобулини се свързват с намиращи се върху плаката рекомбинантни шипчести протеини. След това се добавят маркирани с алкална фосфатаза анти-човешки антитела. При субстратната хидролиза се получава флуоресценция, която се измерва при дължина на светлината 450nm. Методът е автоматичен и полуколичествен, като крайният резултат се определя чрез индекс (I), който се изчислява в зависимост от RFV (relative fluorescence value) на пробата и RFV на калибратора. Като положителни се интерпретират пробите, които са с  $I > 1$ . Изследването се извършва за 30 минути [109].

Относно специфичността и чувствителността на тези методи са проведени редица проучвания. Те показват висока специфичност на всички методи - над 95%, като в някои от тях достига стойности от 98%-100%. Чувствителността зависи не само от начина на провеждане на изследването, а така също и от времето от началото на инфекцията. Най-ниска е в периода 0-7 дни от първите симптомите - около 50% и се покачва през следващата седмица от началото, когато достига 80%-90%. Най-висока чувствителност се измерва след 15-тия ден. Тя е различна в отделните проучвания, при всички от тях е над 90%, като в някои може да достигне до 100% за отделните методи. С това може да се заключи, че без значение от методологията, серологичната диагностика на инфекцията има висока специфичност и в зависимост от времевия интервал може да се характеризира и с голяма чувствителност [113, 114, 115, 116]. Това я прави важна за епидемиологични проучвания и спомага за поставяне на диагноза

на индивида, особено в случаите, когато останалите начини за диагностика не са достатъчни или не могат да бъдат приложени.

## **VII. ВАКСИНО-ИНДУЦИРАН ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР**

### **VII.1. Информационни РНК ваксини срещу COVID-19**

След откриването на рибонуклеиновата киселина (РНК) през 1960 год., много учени започват да изследват възможностите ѝ като средство за терапия и профилактика на различни заболявания. През 1990 год. започват първите големи проучвания на опакована в липиди РНК, като начин да се създаде ефективна ваксина срещу грип или рак. Едва през 2012 год. Geall и колектив успяват по този начин да индуцират имунен отговор в мишки срещу RSV [118]. След това започват разработки на такъв вид ваксини и срещу вируса на HIV и ZIKA [117, 118, 119].

Две са основните причини, които създават затруднение в употребата на информационна РНК (иРНК). РНК е анионна молекула и поради електростатичните взаимодействия (повърхността на клетъчната мембрана е заредена отрицателно) не може да навлезе вътре в клетката. Освен това в екстрацелуларното пространство са налице множество рибонуклеази, които водят до бързото ѝ разрушаване, т.е. молекулата е нестабилна. Опаковането на РНК в липидни наночистици спомага за навлизането ѝ в клетката и я предпазва от действието на рибонуклеазите. Когато попадне в цитозола иРНК преминава процес на транслация и започва експресията на антигена. След като бъде разчетена, РНК преминава процес на разграждане и посредством екзоцитоза излиза извън клетката.

РНК може да бъде въведена в мускулните и епидермални клетки на мястото на поставяне на инжекцията, в клетки на имунната система, намиращи се в тъканите или в лимфоидни органи. Ваксините срещу SARS-CoV-2 се прилагат интрамускулно, което предполага навлизане най-често в неимунни клетки около мястото на апликация. В тях, след като се синтезира антигена, той преминава процес на разграждане в протеозомата и се експресира на повърхността в комбинация с молекули от ГКТС (Главен

комплекс на тъканна съвместимост) клас I, за да бъде представен на CD8+ Т клетките. Задейства се локален процес на възпаление и към мястото навлизат клетки на имунната система – дендритни клетки и макрофаги. Антигенът навлиза в тях посредством ендоцитоза, свързва се с молекули от клас II на ГКТС, експресира се на повърхността и това активира CD4+ Т клетките. След това антиген–представящите клетки навлизат в лимфната система и достигат лимфните тъкани, където посредством CD4+ Т лимфоцитите стимулират В-клетките за производство на антитела. По-ефективния механизъм за представяне на антигена на плазматичните клетки е директното взаимодействие, което се осъществява при преминаването на антигена по периферията към лимфните възли. Взаимодействието на В-клетъчния рецептор с антигена води до навлизането му в клетката посредством ендоцитоза и представянето му на молекулите от клас II на ГКТС. След това В-лимфоцитите могат или да започнат да продуцират антитела с нисък афинитет, или да навлязат в герминативните центрове, където чрез соматична хипермутация да се трансформират в клетки, продуциращи имуноглобулини с висок афинитет. Една част от тези клетки се превръщат в клетки на паметта и при последващо взаимодействие с антигена отключват по-бърз и по-силен имунен отговор.

Основните предимства на тази технология на производство на ваксини са следните. Първо, възможността от нежелани странични ефекти е минимизирана, защото няма риск от развитие на инфекция или токсичност. За разлика от вектор-медираните ваксини, те не навлизат в ядрото на клетката, тоест няма риск от инсерция и мутации в генома. Поради бързото си разграждане експресията на протеини е контролирана. Другото важно условие при производство на ваксини е те да бъдат ефикасни. иРНК ваксините отговарят на това условие, защото експресират единствено необходимия за отключване на специфичен имунен отговор протеин и могат да индуцират както хуморален, така и клетъчен имунитет. Освен това производството им е по-лесно, защото налага само ин витро транскрипция и не изисква клетъчни култури, а геномната секвенция може да бъде променена по-лесно. Това позволява по-голяма производителност, което е особено важно в хода на пандемия [120, 121, 122, 123].

## VII.2. Векторни ваксини

Разработката на рекомбинантни векторни ваксини започва още през 70-те години на XX век [124], но поради липсата на успех и ограниченото им приложение, те все още спадат към новите технологии за производство на ваксини. Основната концепция е въвеждане на вирус, безвреден за организма и съдържащ в генома си ДНК на антигена, срещу който е необходимо да се създаде имунен отговор. След като навлезе в клетката, тази част от вирусната ДНК се транскрибира и се образува иРНК, която бива транслирана и експресирана по механизма, по който това се случва и при иРНК ваксините. Установено е, че по този начин се стимулира както хуморалния имунитет чрез продукцията на антитела, включително вируснеутрализиращи, така и клетъчния имунитет, основно чрез продукцията на Th1 клетки [125]. Изискванията към вируса, който ще бъде използван като вектор е, той да бъде атенюиран, да има висока степен на трансдукция и експресия на гени, да не се интегрира в генома на клетката, тоест да няма генна токсичност и към него да има ниско ниво на имунитет сред популацията. Следвайки тези условия, аденовирусите са избрани като една от най-добрите опции. Към някои от тях обаче сред хората има висок процент на индивиди с вече изграден имунитет [126]. Основната задача на учените при разработката на този вид ваксини е да намерят аденовирус, към който има ниски нива на имунна защита.

Аденовирусите нямат обвивка и се състоят от нуклеокапсид, в който е разположена двойноверижна ДНК. Гените могат да бъдат обособени в две големи групи – такива, които са отговорни за репликацията (E1-E4), и гените кодиращи структурни протеини (L1-L5) [127]. За да бъдат репликационно неактивни аденовирусите и за да служат като вектори, техните гени E1 (E1A и E1B) и E3 биват премахнати посредством генно инженерство и на тяхно място се поставят тези, кодиращи прицелния антиген. При създаване на ваксините срещу SARS-CoV-2 таргет е шипчестия протеин [126, 128]. Освен това протеините в нуклеокапсида също могат да бъдат модифицирани така, че да проявяват тропизъм към определени тъкани, клетъчна специфичност и да бъдат имунологично активни [129].

Ваксината на AstraZeneca използва аденовирус, изолиран от шимпанзе – ChAd, който се размножава в ембрионални клетъчни култури от същия вид. Поставя се интрамускулно и въпреки че имунен отговор се наблюдава дори и след първа доза, за да има по-високо ниво на защита се препоръчва прилагането на две дози, в интервал от около 12 седмици. Във фазите на проучване на ваксината се установява над 75% ефективност 14-21 дена след поставяне на втората доза срещу симптоматично протичане на инфекцията при лица на възраст от 18г. до над 70-годишни, като не се наблюдава разлика в процента на ефикасност при различните възрастови групи [130, 131].

Ваксината на Janssen използва като вектор Ad26 – човешки аденовирус, към който се среща по-често серопозитивност сред популацията. Въпреки това в една от фазите на клинично изпитване, която обхваща 44 325 индивида от различни континенти, се показва 66% ефективност спрямо среднотежко и 85% ефективност срещу тежко протичане на заболяването 28 дена след ваксинацията [132]. В едно по-малко проучване, проведено върху 25 индивида, се установява продукцията на антитела срещу RBD на Spike-протеина и индуциране на клетъчен имунен отговор 8 дни след прилагане на ваксината на Johnson&Johnson [133]. Тя се поставя отново интрамускулно и посочената ефективност се наблюдава след прилагане на една доза. Това я прави логистично по-лесна за приложение сред по-големи групи от хора.

### **VII.3. Продължителност на хуморалния имунитет след ваксинация срещу COVID-19**

Много проучвания са направени за продължителността на хуморалния имунитет след прилагане на иРНК ваксините на Pfizer/BioNTech и Moderna. Най-мащабното от тях е национално израелско проучване, което включва данни за брой ваксинирани и брой положителни PCR тестове, предоставени от здравното министерство, и включва над 4 700 000 лица [134]. Установено е, че сред тях честотата на инфекции при популацията от хора над 60 години е по-голяма при ваксинираните през януари и намалява при ваксинирани през месеците февруари, март и април . При изследване на 42 094 участници на възраст над 12 години, без данни за предишно боледуване, включени във фази I,II,III на клинични изпитания за BNT162b2, се наблюдава над 90%

ефективност срещу тежко боледуване за периода от 7 дена до 6 месеца след поставяне на втората доза [135]. Друго израелско проучване сравнява динамиката в продължителността на имунитета при преболедували (n = 4 361) и ваксинирани с две дози от ваксината на Pfizer/BioNTech (n = 2 653) и показва, че един месец след завършване на ваксинационния курс или след боледуване титрите на вируснеутрализиращи антитела са по-високи в групата на ваксинираните индивиди. След това спадането им е с до 40% на месец в групата на ваксинираните и около 5% в групата на преболедувалите, като след 6 месеца 16,1% от ваксинираните са серонегативни, докато 10,8% от боледувалите са серонегативни след 9 месеца [136].

При изследване на 34 здрави индивиди 90 дена след поставяне на втората доза от mRNA 1273 ваксината се установява 100% серопозитивност, но в този период започва да се наблюдава понижаване на титрите [137]. В друго проучване се установява наличие на антитела 6 месеца след завършване на ваксинационния курс, въпреки че стойностите са по-ниски в сравнение със засечените в пиковия период – 2 седмици след втората доза [138]. Вируснеутрализираща активност има при 54% от тях срещу Beta варианта (B.1.351) и 96% срещу варианта Delta (B.1.617.2) след 7 месеца. Високи стойности на антителата се откриват и в серумите на 33 здрави индивиди 209 дена след ваксинацията [139].

#### **VII.4. Ефикасност на ваксините при имуносупресирани пациенти**

При пациенти с ревматологични заболявания се откриват следните проучвания относно ефективността на ваксините. Едното включва 123 пациенти, получили една доза от ваксините на Pfizer/BioNTech или Moderna в приблизително еднакъв брой и е установено, че 18-26 дни след ваксинацията 74% от тях са серопозитивни към RBD на SARS-CoV-2 [140]. Въпреки че проучването обхваща малък брой пациенти, без да има достатъчно данни за вида и начина на приложение на имуносупресивната терапия, по-често липса на антителен отговор се наблюдава при пациенти, приемащи mусophenolate morphetil и rituximab. В същото време при 94% от тези на терапия с анти-TNF се установява серопозитивност. В друго проучване на 264 пациенти, получили

две дози ваксина, без да се променя хода на тяхната основна терапия, се установява 86% серопозитивност спрямо IgG [141]. При изследвани на 84 болни от имунно медиирани възпалителни заболявания и 182 здрави лица се констатира 100% положителен отговор, като 99,5% са имали вируснеутрализиращи антитела в контролната група, докато при пациентите със заболяване, пет човека не са успели да изградят антитела и 90,5% са били позитивни за вируснеутрализация [142].

Данните относно ваксинацията на пациентите на хемодиализа са обнадеждаващи и показват висок процент на сероконверсия, което предполага включването им като приоритетна група във ваксинационните кампании [143]. Така при проследяване на 50 болни, ваксинирани с две дози от BNT162b2 ваксината на Pfizer за период от 90 дни, се установява, че 97,9% от тях имат положителни стойности на IgG след втората доза [144]. Изследване на 83 пациенти, серонегативни преди началото на ваксинацията, показва 26,9% сероконверсия след първата доза и 89,8% след втора или трета доза от ваксината на Pfizer. Трета „игла“ е поставена на 12 болни, които са имали отрицателни стойности на антителата след приложение на втората доза [145].

При пациенти след трансплантация на органи, необходимостта от прилагане на имunosупресивна терапия води по-рядко до положителен хуморален имунен отговор след ваксиниране. При изследване на 120 бъбречно трансплантирани, 2-4 седмици след втората доза на BNT162b2 ваксината, серопозитивност за IgG е установена при 43,4% сравнено с 98,5% при контролната група от здрави лица [146]. Положителни стойности на антителата се констатират в 65% от ваксинираните с mRNA 1273 ваксината на Moderna при имunosупресирани вследствие трансплантация на бъбрек, което отново е по-малко в сравнение с имунния отговор в останалата популация [147]. Подобна зависимост се наблюдава и при 80 чернодробно трансплантирани пациенти, от които 47,5 % имат положителни стойности на IgG и титрите са по-ниски в сравнение със здрави индивиди [148]. В тези проучвания отново се посочват най-ниски стойности на сероконверсия на фона на терапия с mycophenolate mofetil, докато отрицателните ефекти при

терапия с cyclosporine и кортикостероиди са по-слабо изразени.

При изследване на 263 пациенти със злокачествени новообразувания се установява серопозитивност при 29% след първа доза от ваксината BNT162b2 и 86% след втора доза, като липсата на имунна реакция по-често се асоциира с тежка левкопения [149]. Положителен имунен отговор при по-голямата част от онкоболните пациенти се наблюдава и в други изследвания. В тях не се посочва връзка между вида на новообразуването и провежданата терапия и степента на серопозитивност. При пациенти с онкохематологични заболявания обаче положителни стойности на антителата се установяват в по-малък процент и титрите при тях обикновено са по-ниски [150, 151].

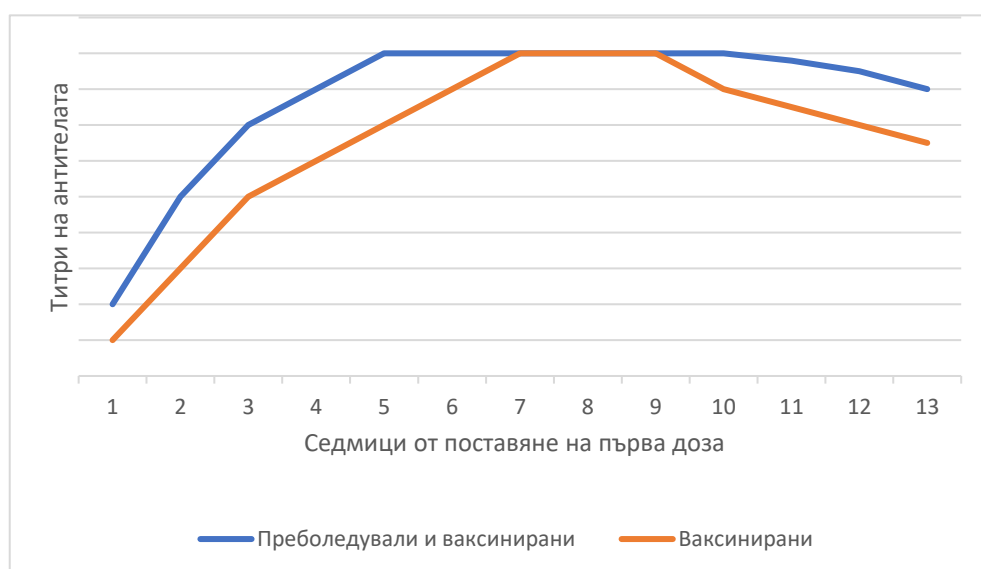
При ваксиниране на болни, подлежащи на имunosупресия/имуномодулация трябва да се съобразят два основни фактора. Първо, за предпочитане е болните да са в ремисия от основното заболяване, за да се елиминира рискът от неговата екзацеребрация. Второ, терапията и ваксинацията трябва да бъдат съобразени във времето една с друга и в зависимост от вида на прилаганото лекарство, състоянието на пациента и необходимостта при лечението на конкретното заболяване [152].

## **VII.5. Ефикасност на ваксините срещу SARS-CoV-2 при преболедали**

Налице са редица проучвания относно имунния отговор при ваксинация на пациенти, които са серопозитивни преди поставяне на първа доза иРНК ваксина. При всички тях се установява относителна сходна динамика на антителата в двете групи (фигура 4). След поставяне на първа доза при преболедали лица, IgG и вируснеутрализиращи антитела се установяват в серума на около осмия ден, като съществува положителна връзка между тежестта на протичане на заболяването и количеството антитела. Симптомите, които се посочват като основни за интензитета на имунния отговор са: гастроинтестинални нарушения, треска, мускулни болки, дисосмия/аносмия и дисгезия/агезия. При непреболедали серопозитивност започва да се наблюдава около 11 - 22 ден. При поставена първа доза преболедалите показват по-силен имунен отговор в сравнение с

непреболедувалите. Освен това по-високите стойности преди имунизация корелират и с по-високи стойности на антителата след това.

След втората доза при непреболедували продължава покачването в титрите, достигайки своя пик около 2 седмици след апликацията. Стойностите на антителата при серопозитивни преди ваксинацията навлизат в плато и почти не се наблюдава допълнително покачване. Освен това в две от проучванията са констатирани индивиди, при които е налице понижаване на IgG. След 50 дена при преболедувалите се наблюдава задържане на показателите в платото, докато при непреболедувалите започва спад в стойностите. Титрите на антителата при непреболедували и ваксинирани на 50-ти ден са съпоставими с тези на преболедували 60 дни от началото на инфекцията [153, 154, 155, 156, 157].



*Фигура 4: Динамика на антителата при индивиди които са преболедували и ваксинирани и при лица, серонегативни преди поставяне на първата доза.*

*Графиката е съставена въз основа на проучванията, разгледани в т. VII.5. [153-157]*

При анализ на данните, получени от 215 ваксинирани индивиди и 130 неваксинирани, но преболедували (симптоматично или асимптоматично) се установяват следните твърдения: при измерване титрите на антителата 24

дни след поставяне на първата доза се установяват по-високи такива при ваксинираните с mRNA-1273 и по-ниски при тези с BNT162b2, сравнено с преболедевалите, но след поставяне на втората доза и при двата вида ваксини са измерени по-високи стойности на имуноглобулините в сравнение с неваксинираните, но боледували индивиди. От 22 човека, получили Ad26.CoV2.S след 24 дена, при 6 от тях (27,3%) не се установяват антитела, а при тези, при които са налице положителни стойности, титрите са по-ниски в сравнение с измерените на фона на поставена иРНК ваксина. Но и при трите вида ваксини се наблюдава по-силен имунен отговор при лица, които са боледували от вируса, преди да бъдат ваксинирани, дори и след само една доза, като покачването отново е по-високо при прилагане на Pfizer/BioNTech или Moderna [158].

Индукциране на имунен отговор по двата начина – преболеждане и ваксинация може да доведе до по-силен и по-продължителен имунитет срещу повторно заразяване, но за да се заключи това, са необходими още проучвания. Антителата, образувани при имунопрофилактика, са специфично насочени към RBD на S-протеина и разпознават различни негови участъци, включително и по – консервативните корови региони. Това прави имунитета едновременно хомогенен и по – устойчив на мутации в RBD участъка и по-ефективен при нови изменения във вируса. При преболеждане се изграждат имуноглобулини, насочени към различни протеини на вируса. Така тези, които са необходими за ефективна неутрализация остават в по-малко количество. При серопозитивни индивиди имунния отговор е още по-силен вследствие ваксинация и е за предпочитане пред имунитета само след преболеждане [156, 159].

### **Значение на хуморалния имунитет срещу обезпокоителните варианти**

Както беше споменато, към януари 2022г. в категорията на обезпокоителните варианти спадат обозначените като Delta и Omicron. Тяхното разпространение и възможностите им за преодоляване на имунитета след преболеждане и ваксинация са от изключително значение за определяне хода на пандемията и стратегията на медицинските специалисти и правителствата за ограничаване на здравните, икономическите и социалните щети и затова са обект на редица проучвания.

Проведено е голямо проучване в Израел, което разглежда хуморалния имунитет срещу Delta-вариантът. Наблюдавани са ваксинирани с BNT162b2, преболедали и ваксинирани, и само преболедали индивиди, като се обособяват три модела. В първия от тях се сравняват ваксинирани и преболедали, при които срещата с антигена е била в един и същ период от време, като във всяка група са включени по 16 215 човека. В хода на проследяване са възникнали 238 инфекции в групата на ваксинираните, т.нар. „пробивни инфекции“, от които 191 симптоматични и 8 хоспитализации и 19 при само преболедали, тоест реинфекции, като 8 са протекли със симптоми и 1 е бил хоспитализиран. В този модел се доказва по-голям риск от пробивни инфекции, както и по-голяма честота на проявените такива. Във втория модел се разглеждат по 46 035 човека във всяка от двете групи, като тук периодите на ваксинация и преболедаване са различни. В хода на проследяването са констатирани 640 инфекции при ваксинирани и 101 при преболедали, като се потвърждават зависимостите, установени в модел 1. След това са анализирани 14 025 боледали и същия брой лица, които са боледали и имат поставена една доза от ваксината. Засечени са 37 реинфекции при индивиди само с естествено придобит имунитет и 20 такива при пациентите, които са и ваксинирани. Това проучване доказва по-голяма честота на инфекциите само при ваксинирани сравнено със само преболедали, но високи нива на защита при хора, които са индуцирали имунен отговор и по двата начина [160].

При изследване на серуми на ваксинирани с ChAdOx1 и BNT162b2 се установяват следните проценти на ефикасност на ваксините. Тези, които са ваксинирани с две дози на AstraZeneca/Oxford преди повече от 15 седмици не показват ефективност срещу Omicron – варианта и 41,8% срещу Delta, докато завършилите ваксинационния курс с Pfizer/BioNTech в същия период от време имат ниво на защита от 34%-37% за Omicron и 63,2% за Delta. Ако същата ваксина е поставена преди 2-9 седмици, ефективността ѝ може да достигне над 88% и за двата псевдовируса. След 2 седмици от поставянето на бустерна доза на Pfizer се установява 75% действие при ваксинирани със същия препарат и 71% при лица с поставена преди това ваксина на AstraZeneca за B.1.1.529 и над 90% защита срещу B.1.617.2 [161]. Подобни

зависимости са установени и в друго изследване, в което се измерва потенциала на вируснеутрализиращите антитела от серуми на пациенти, получили някоя от двете ваксини, както и при такива с хетероложна ваксинация. Тук е включена и група на ваксинирани с първа доза от ChAdOx1 и втора доза от BNT162b2 и при тях се установява много нисък потенциал срещу Delta варианта и липсващ такъв срещу Omicron [162]. При изучаване вирусната неутрализация след прилагане на бустерна доза срещу двата псевдовируса, сравнено с дивия тип, при 88 реципиента на mRNA1273, 111 на BNT162b2 и 40 на Ad26.COVS се заключват следните твърдения. При лица без поставена трета, респективно втора доза, почти не се наблюдава неутрализиращ ефект срещу B.1.529 и той е силно понижен срещу B.1.617.2 сравнено с оригиналния вариант. След поставяне на бустер, от която и да е иРНК ваксина, ефикасността значително се повишава срещу всички изследвани псевдовируси на SARS-CoV-2, като тя е по-висока при първоначално получените Pfizer/BioNTech или Moderna, и е по-ниска при първоначално ваксинираните с ваксината на Janssen. На фона на данните за почти липсваща активност на посочената векторна ваксина срещу Omicron, проучването доказва значението на прилагането на иРНК ваксина сред тази популация [163].

От разгледаните дотук разработки се доказва голямото значение на ваксинацията на преболедували лица, такива, които са ваксинирани с ваксина, използваща векторен вирус, както и поставянето на бустерна доза при ваксинираните с mRNA1273 или BNT162b2. Това налага преразглеждане стратегията за ваксиниране на по-голям брой индивиди за по-кратък период от време с оглед на разпространението на Omicron-варианта, а и последващите след това мутации на SARS-CoV-2. Индуцирането на вируснеутрализиращ хуморален имунен отговор с по-голям потенциал е основно средство за справяне с пандемията и защита на популацията от тежко протичане на заболяването, което може да доведе до сериозни усложнения и смърт.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

1. Проследяване концентрациите на антителата при преболедали за период от 12 месеца:
  - 1.1. Изследване на антитела от клас IgG;
  - 1.2. Изследване на антитела от клас IgA;
  - 1.3. Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
2. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани неболедали индивиди за период от 12 месеца:
  - 2.1. Изследване на антитела от клас IgG;
  - 2.2. Изследване на антитела от клас IgA;
  - 2.3. Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
3. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани и преболедали индивиди за период от 12 месеца:
  - 3.1. Изследване на антитела от клас IgG;
  - 3.2. Изследване на антитела от клас IgA;
  - 3.3. Изследване на вируснеутрализиращи антитела;
4. Сравнение на получените резултати между преболедали, ваксинирани неболедали и ваксинирани боледали
5. Проследяване концентрациите на антителата при ваксинирани с бустерна доза за период от 3 месеца:
  - 5.1. Изследване на антитела от клас IgG;
  - 5.2. Изследване на антитела от клас IgA;
  - 5.3. 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 преболедали индивиди, които преди това са ваксинирани

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

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### I. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

В хода на проучването са изследвани антитела от клас IgG, IgA и вируснеутрализиращи антитела (VNAb) 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.

*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

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 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

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.

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.

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 преболедали средните стойности бяха определени при 46 участници. В групата на ваксинирани и неболедали бяха включени 46 участници, като при всички е поставена иРНК ваксина. В групата на ваксинирани и боледали 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“.

## II. МЕТОДИ

### II.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.

#### 1. Съдържание на тест – кита

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

- Наконечници – Solid Phase Receptacles (SPR) 9COG– 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
- Отрицателна контрола (C2)

#### Изпълнение на метода

##### 1. Подготовка на апарата за използване

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.

## 2. Подготовка на изследването

- 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
- Стартира се програмата според инструкциите на апарата

## 3. Извършване на теста

Всички стъпки се извършват автоматично от апарата.

- 3.1. 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.
- 3.2. При втората реакционна стъпка IgG антителата се разпознават специфично от анти-човешки IgG, маркирани чрез алкална фосфатаза. Несвързаните компоненти се премахват чрез отмиване.
- 3.3. 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.

## 4. Анализ на резултатите

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:

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

## 5. Чувствителност и специфичност на метода

Проучването, проведено от производителя относно специфичността и чувствителността на метода показва следните данни. От 989 пациентски проби, придобити преди появата на SARS-CoV-2, само при 1 е получен фалшиво положителен резултат за IgG, което показва специфичност от 99.9%. Не е открита кръстосана реактивност между IgG и IgM антителата. Проследени са и възможните взаимодействия с други фактори, които биха могли да окажат влияние върху резултата, като например антитела към други вирусни и протозойни инфекциозни причинители или автоантитела. От 5 проби, които са били положителни за ревматоиден фактор, 1 е показала фалшиво – положителен резултат. Същото съотношение е наблюдавано и при серуми, положителни за антитела към HIV.

Чувствителността на метода се определя в зависимост от дните от началото на инфекцията (от първите симптоми или от положителен RT-PCR - тест). Проследени са 120 пациенти с потвърдена SARS-CoV-2 инфекция и е определена следната чувствителност:

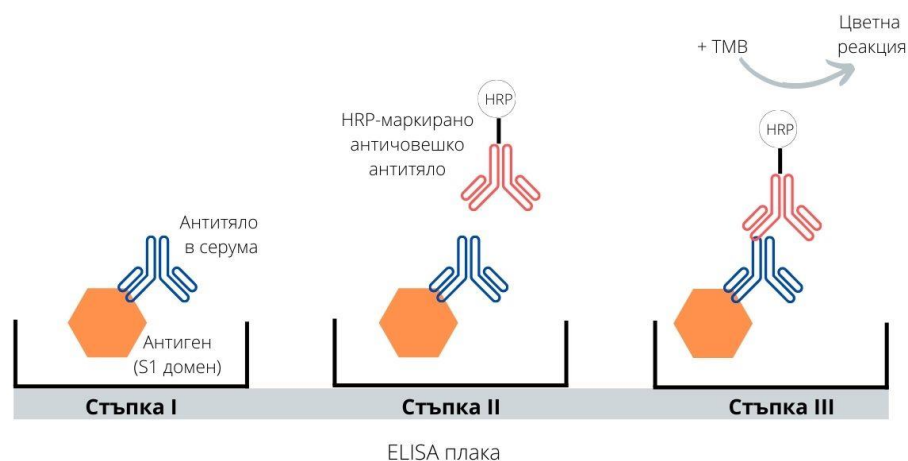
Дни от положителен PCR-тест	Чувствителност
8-15 дни	88.6%
≥ 16 дни	96.6%

## 6. Ограничения на метода

- Провеждане на изследването в твърде ранен период от началото на инфекцията
- Наличие на антитела в серума към някой от компонентите на реагентите

## II.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 5). 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 5. Принцип на ELISA метода за детекция на anti-S IgA

1. Изпълнение на метода:

- Пробите и реагентите се темперират на стайна температура (18°C - 25°C) за 30 минути.
- 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
- Вортексиране на пробите с буфера
- 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
- Промиване на ямките с 300 µl разтвор за промиване 3 пъти, като на всеки промивен цикъл се изчаква 30 – 60 секунди
- В ямките се добавя по 100 µl ензимен античовешки IgA конюгат
- Инкубира се 30 минути в термостат на температура 37°C
- Промиване на ямките 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 – ТМВ (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.

## 2. Анализ на резултатите

Определя се валидността на теста чрез отчитане Optical density (OD) на калибратора и контролите. Резултатът е валиден при следните стойности:

Показател	Очакван резултат
Калибратор	OD > 0.140
Положителна контрола	Ratio 1.3 – 3.5
Отрицателна контрола	Ratio 0 – 0.7

Резултатите се изчисляват 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

Получен резултат	Интерпретация
Ratio < 0.8	Отрицателен резултат – не са налични IgA антитела срещу SARS-CoV-2
$0.8 \leq Ratio < 1.1$	Гранична стойност
Ratio $\geq 1.1$	Положителен резултат – налични IgA антитела срещу SARS-CoV-2

## 3. Ограничения на метода

- Провеждане на изследването в ранен етап на инфекцията
- Температурата на помещението може да окаже влияние върху крайния резултат, защото свързващата активност на антителата и активността на използваните ензими са температурно – зависими
- Неспазване на пипетиращите обеми и времето за инкубация

- Недостатъчно промиване на ямките може да доведе до фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати
- Остатъчна течност в ямките след промиване може да взаимодейства със субстрата и да доведе до фалшиво отрицателни резултати

#### 4. Специфичност и чувствителност на метода

Според проучване на производителя, което обхваща 124 пациенти с положителни RT-PCR тестове за SARS-CoV-2, чувствителността на теста варира в различните периоди от началото на инфекцията и е както следва:

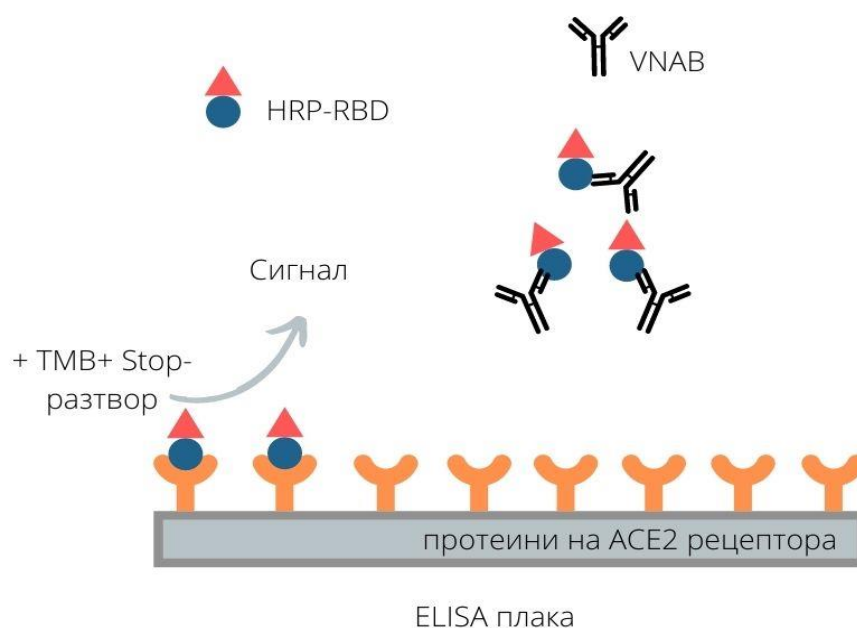
Дни от положителен тест или първи симптоми	Чувствителност
≤ 10	88.2%
11 - 60	96.9%
>60	84.6%

Специфичността е определена чрез изследване на 1262 проби, от които 1052 набавени от донори, включително бременни и деца, преди появата на SARS-CoV-2 и 210, които са били положителни за други коронавируси, други вируси или ревматоидни фактори. Показаната обща специфичност след анализ на различните взаимодействия е 98.3%.

### II.3. Изследване на вируснеутрализиращи антитела (VNAб)

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 6).

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  $-20^{\circ}\text{C}$ , съгласно инструкциите на производителя.



Фигура 6. Схематично представяне на реакцията за определяне на вируснеутрализиращи антитела (VNAB)

#### 1. Изпълнение на метода

- Пробите и работните китове се темперират на стайна температура ( $18^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$ ) за около 30 мин.
- Вортексиране на пробите или контролите
- Приготвяне на разреждания
  - В Епандорф епруветка се правеше разреждане - HRP-RBD : Буфер за разреждане на HRP-RBD в съотношение 1:1000 (в зависимост от броя на ямките, които ще бъдат използвани, обикновено 1  $\mu\text{l}$  HRP-RBD и 1000  $\mu\text{l}$  буфер)
  - В Епандорф епруветки, обозначени с номера на пробата се правеше 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 разредения 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.

- По 100 µl от инкубираната смес от т.4 се накапва в ямките на плаката, предварително натоварени 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 полепват по плаката, докато комплексите HRP-RBD и вируснеутрализиращи антитела остават в супернатанта, който след това се промива.

- Във всяка ямка се накапва 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 рийдър при дължина на вълната 450nm.

## 2. Анализ на резултатите

За валидиране на резултатите се отчитат стойностите на положителната и отрицателната контрола. Измерената оптична плътност трябва да отговаря на следните параметри:

Положителна контрола	OD450 Value < 0.3
Отрицателна контрола	OD450 Value > 1.00

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 ≥ 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

## 3. Специфичност и чувствителност на метода

С цел определяне специфичността на метода производителя е провел изследване за кръстосана реактивност между антителата срещу SARS-CoV-2 и тези към други вирусни инфекциозни причинители. В проучването са включени други представители на коронавирусите и други вируси, при които заболяването протича с подобна на COVID-19 симптоматика. Открита е единствено слаба кръстосана реактивност с антителата към SARS-CoV-1. От 60 пациенти с антитела към SARS-CoV-1, фалшиво положителни резултати за SARS-CoV-2 са получени при 2 от тях.

Освен това е направена сравнителна характеристика с препоръчания от СЗО и смятан за „златен стандарт“ Plaque Reduction

Neutralization Test (PRNT). Общо 114 проби, от които 26 на преболедали SARS-CoV-2 индивиди, доказани с положителен RT-PCR са изследвани с теста на GenScript и чрез определяне PRNT<sub>50</sub> и PRNT<sub>90</sub>. Констатирано е 100% съвпадение между sVNT и PRNT както за положителните, така и за отрицателните резултати. С това се показва високата специфичност и чувствителност на метода.

#### 4. Ограничения на метода

- 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

### III. 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 броя на антителата на отделните групи пациенти (преболедали, преболедали и ваксинирани, ваксинирани и преболедали, ваксинирани с две дози и ваксинирани с три дози) през отделните периоди и месеци. При 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 броя на антителата на отделните групи през отделните периоди и месеци е използван тест на Стюдънт (**Student's t-**

**test**). 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<sub>0</sub>**: *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<sub>1</sub>**: *Статистически значима разлика между средните стойности на броя на антителата за сравняваните групи съществува*). В противен случай не бихме могли да изразим подобно твърдение и да отхвърлим нулевата хипотеза за избраното ниво на значимост.

За количествената оценка на корелационните зависимости между отделните параметри беше използван корелационен коефициент на **Pearson (R)**. За качественото определяне на степента на корелация и нейното тълкуване беше използвана следната скала:

0 < R < 0,3 – слаба корелация

0,7 < R < 0,9 – висока корелация

0,3 < R < 0,5 – умерена корелация

0,9 < R < 1 – много висока корелация

0,5 < R < 0,7 – значителна корелация

В дисертационния труд беше обърнато внимание и бяха коментирани двойките параметри, при които е налична умерена или по-голяма корелация (**R ≥ 0.3**). **За проверка на достоверността на коефициента беше използвана стойност на p-value ≤ 0.05.**

## **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“.

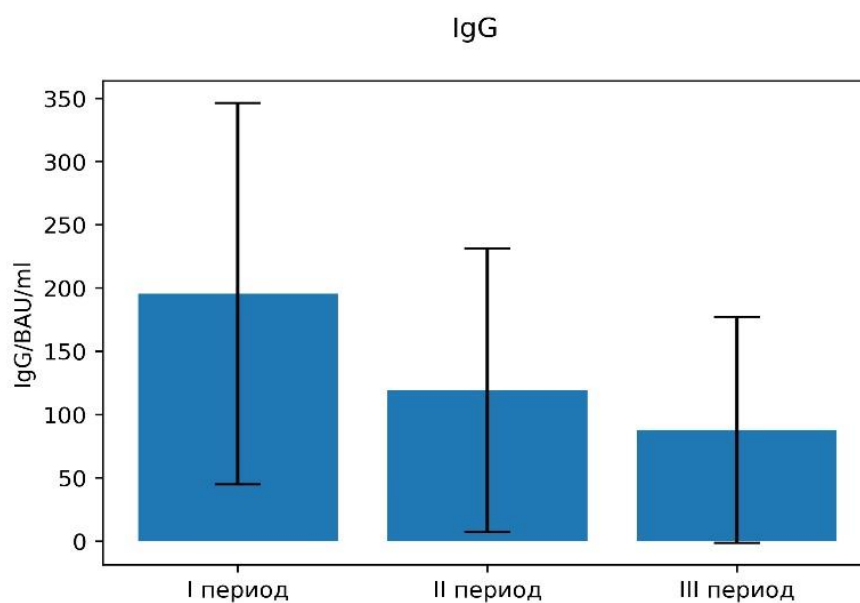
## **РАЗДЕЛ I. ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ПРИ ПРЕБОЛЕДУВАЛИ**

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. Стойностите на антителата са проследени за една година от началото на инфекцията, като периодите на измерване са обособени по следния начин: Период I включва измерванията, направени от 30-тия до 90-тия ден от началото на инфекцията, период II е от 91-вия до 210-тия ден и период III включва данните от 211 – тия до 360-тия ден. 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 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 (8.33%) са измерени отрицателни стойности. При измерване в някой от следващите периоди за двама от тях отново са установени отрицателни стойности (при един във втори период и при един в трети период). За един от тях е измерена гранична стойност от 20.33 BAU/ml във втори период. От 37 човека във втори период при трима резултатите са били под границата (3/37), като при един от тях в период I титрите на антителата са били 20.33 BAU/ml. В трети период 6 от 32 (6/32) резултатите са под граничната стойност. При трима от тях са били налице

положителни стойности в период II, като количеството на антителата е било ниско - в границите от 28.971 BAU/ml до 41.067 BAU/ml. Така средните стойности на антителата, при които резултатите са над cut-off value по периоди са определени при следния брой лица: за период I – 33 , период II – 34 и период III – 26. На фигура 7 е представена динамиката на средните стойности на IgG в трите периода:



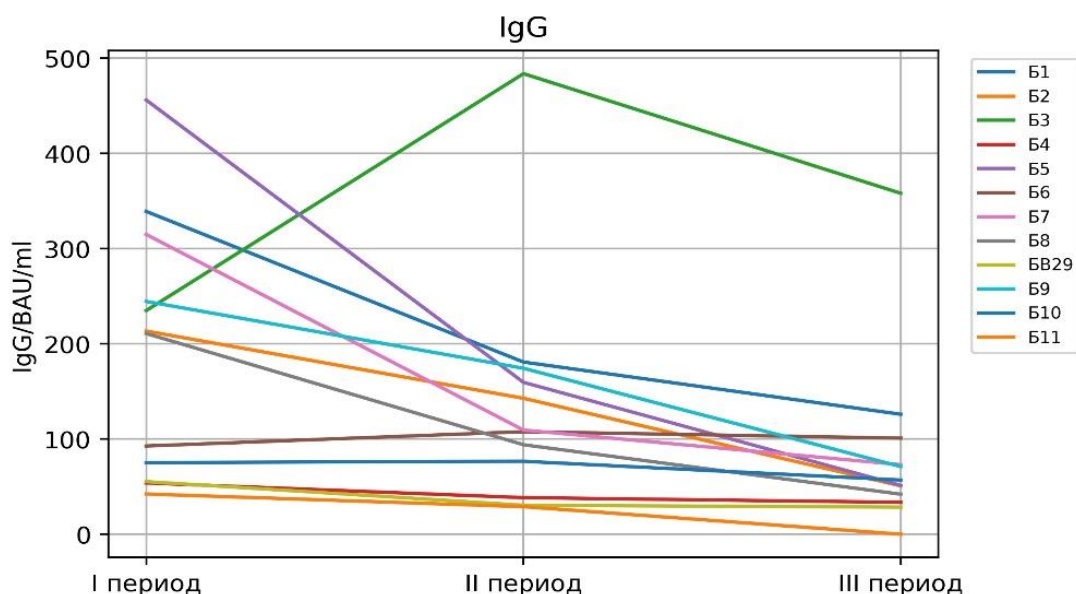
*Фигура 7. Средни стойности на IgG в период I, II и III при преболедували*

От графиката се вижда, че данните са в широк диапазон, и за да бъде намалена неопределеността, е необходимо по-голямо количество изследвани индивиди. 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 8.



Фигура 8. 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:

<b>No период vs No период</b>	<b>p - value</b>
I vs II	0.018
II vs III	0.215

От получените стойности на Т-статистиката може да се каже с над 98% вероятност, че съществува статистически значима разлика в средните стойности на антителата между период I и период II. Поради голямата неопределеност и малката разлика в средните стойности между II и III период не бихме могли да твърдим, че съществува статистически значима разлика.

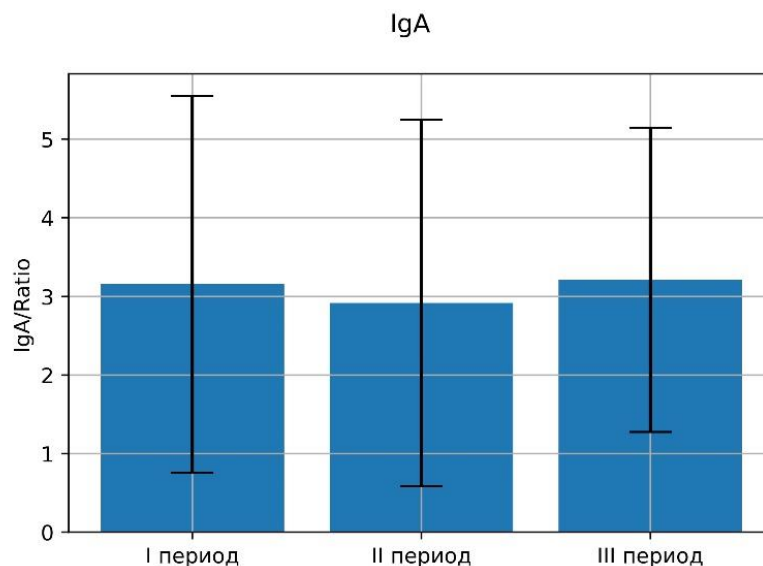
За да бъде даден числов израз в динамиката на антителата, изчислихме процента на спад между отделните периоди. Така между период I и II спадът е 39.03%, между II и III – 26.26% и общото понижаване между I и III период е с 55.05%.

## **I.2. Антитела от клас IgA**

При същата група от 46 преболедували здравни работници са изследвани и антитела от клас IgA и 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, което означава, че резултатът е отрицателен. За един от тях обаче във втори период резултатът е бил положителен с  $R = 2.07$ . При друг от тези трима в последващите измервания резултатът е бил в граничната стойност с  $R = 0.85$ . На фона на отрицателните резултати за IgA, IgG и при тримата е с положителни стойности, съответно: 53.875 BAU/ml ; 23.583 BAU/ml и 243.147 BAU/ml. Освен това при пациента, при когото се наблюдава значително повишаване на IgA между първи и втори период, повишаване е установено и при IgG – от 23.583 BAU/ml до 45.366 BAU/ml, което е вероятно резултат от по-късна сероконверсия при този пациент. 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. При тримата с гранични стойности на IgA, за IgG са получени следните резултати: 38.424 BAU/ml; 159.591 BAU/ml; 106.326 BAU/ml. При тримата отрицателни за IgA,

стойностите на IgG са били съответно: 20.33 BAU/ml ; 72.578 BAU/ml и 219.564 BAU/ml. При двама от преболедевалите с IgA в граничния интервал през втори период, се наблюдава слабо покачване през трети период съответно с  $R = 1.44$  и  $R = 1.41$ . В период III трима от 24 пациенти (3/24) имат гранични резултати за IgA, докато IgG е положителен със следните стойности: 33.545 BAU/ml ; 71.115 BAU/ml и 56.924 BAU/ml. И при тримата от тях предишните измервания са показали относително ниски стойности на ratio и не се наблюдава значително понижаване. Въпреки че на фона на отрицателни или гранични стойности на IgA, IgG е  $\geq 20.33$  BAU/ml следва да се отбележи, че стойностите на IgG са ниски. Изключение се наблюдава само при един пациент, при когото IgG е повече от средната стойност за съответния период. Следва да се уточни, че измервания на IgA не са направени при получаване на отрицателни стойности за IgG и не може да се направи заключение за стойностите на IgA при липса на IgG.

На фигура 9 е представена средната стойност на динамиката на IgA антителата по периоди.



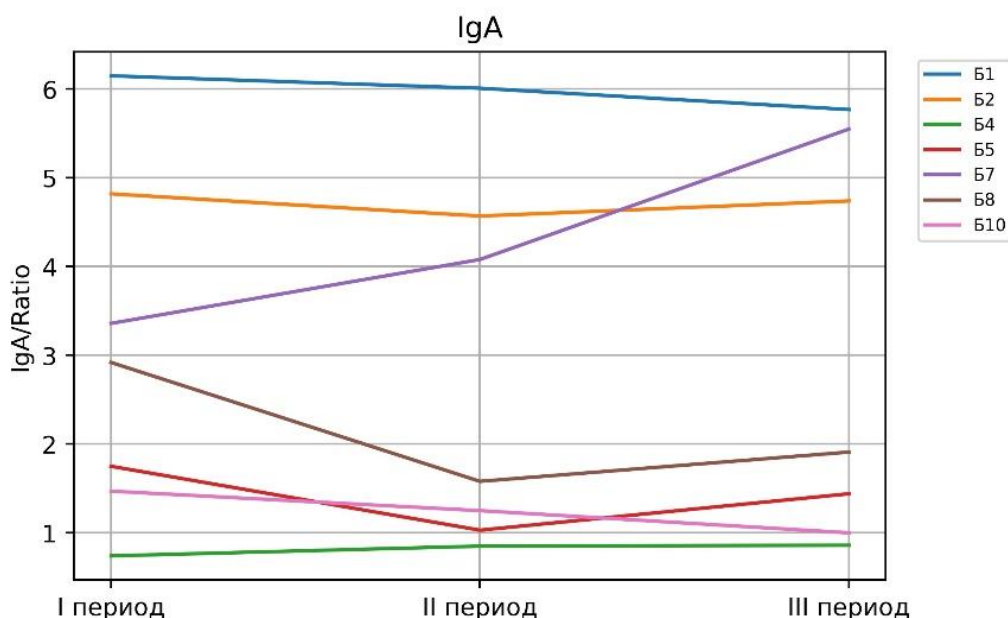
*Фигура 9: Средни стойности на IgA в период I, II и III при преболедевали*

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. Поради голямата неопределеност вследствие от големия диапазон на данните и по-малкото на брой изследвания не може да се заключи със сигурност липсата на спад на антителата. На таблица 5 са представени минималната положителна стойност, която е измерена, максималните и средните стойности по периоди. На фигура 10 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 преболедували 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



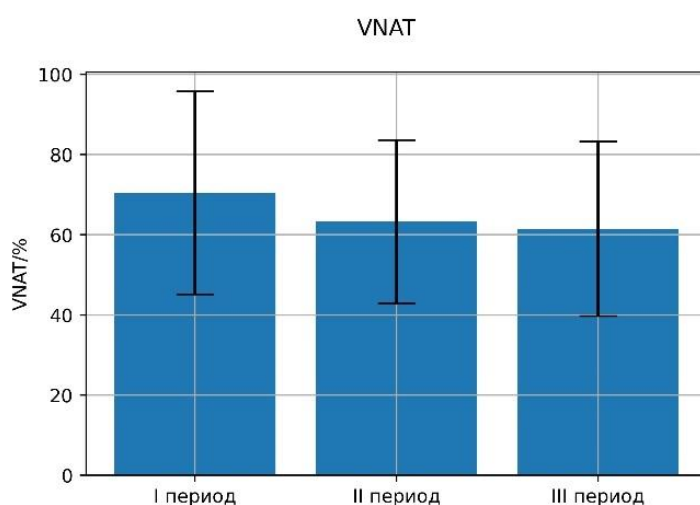
Фигура 10. Динамика на anti-S IgA при участници с налични изследвания и в трите периода

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), при които процентът на инхибиране е бил съответно 30%, 26,3% и 16,7%. Стойностите на IgG при тези пациенти са били: 78.983 BAU/ml, 20.33 BAU/ml и 74.205 BAU/ml. Антителата от клас IgA са били също над положителните съответно: R = 1.31; R = 2.3 и R = 1.1. Въпреки че и при IgG и при IgA се наблюдават положителни или гранични резултати, те са ниски и са под измерените средни стойности за период I. В следващите периоди не е извършено изследване на вируснеутрализиращи антитела при тези пациенти. Във втори период I  $\leq$  30% е получена при 2 пациенти (2/27). При тях измервания са направени само в този период, защото в другите два периода IgG е отрицателен. За този период, въпреки че са положителни, стойностите на IgG са ниски: 20.33 BAU/ml и 41.067 BAU/ml. Не са изследвани антитела от клас IgA. В период III при един (1/24) работник резултатът е отрицателен, като при него IgG е гранично - 20.33 BAU/ml. Стойността на R за IgA е над средната за съответния период – 2.37.

От изложените данни за процента на вирусна инхибиция на антителата следва да се заключи, че при всички индивиди с отрицателни резултати IgG също е в границите на ниските стойности във всички периоди на измерване, т.е. при тези пациенти се наблюдава слаб имунен отговор. Освен това при нито един пациент не се забелязва силен спад на вируснеутрализиращи антитела от положителни към отрицателни стойности. На фигура 11 е представена динамиката в средните стойности на процента инхибиране.



*Фигура 11. Средни стойности на процента вируснеутрализиращи антитела за период I, II и III при преболедали*

На графиката се вижда, че неопределеността в стойностите е по-ниска, отколкото за другите видове антитела, т.е. данните са в по-малък диапазон около средната стойност.

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 преболедували 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.

T – 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 преболедуване, 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, VNAb 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.

### 1.5. Обсъждане

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 [80, 164, 165], 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. Така например за SARS-CoV само 1 от 18 пациенти не е имал антитела към вируса след измерване направено между 540-720 ден от началото на инфекцията [166]. За MERS-CoV при 7 проследени индивиди се наблюдава бърз спад през първите 6 месеца, относителна стабилност между 6-12 месец и наличие на вируснеутрализиращи антитела при 6 от тях след 34 месеца [93]. В друго

проучване се акцентира върху значението на тежестта на заболяването, като участници, които са имали тежка форма на боледуване, образуват подълготраен имунен отговор, установен повече от 2 години от началото на инфекцията, докато боледувалите леко и средно тежко по-често са серонегативни или показват ниски стойности на антителата след този период [167]. 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 [35, 36, 37].

### **I.5.1. Антитела от клас IgG срещу RBD на S-протеина**

В настоящето проучване установихме, че за първите два периода, т.е. 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. Между 8-ми и 12-ти месец от началото на инфекцията установихме положителни стойности за IgG при 81.25% от изследваните индивиди.

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, при които получените стойности са както следва: при изследване на 26 здравни работници се установява, че 92.3% от тях са положителни за анти-RBD IgG на третия месец от началото на инфекцията [168]. В едно по-голямо проучване, проведено в Исландия върху 1215 индивиди, се посочва 91.1% серопозитивност до 4 месеца след боледуването [169]. 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. Положителни стойности за анти-S IgG се измерват при 92.3% от 52-ма преболедували индивиди след 6 месеца [170] и при 88.5% от 237 участници, наблюдавани в период от 28-142 ден от констатиране на инфекцията [171]. 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 [172]. 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 [173]. Друго проучване посочва същата динамика при проследяване за период от 1 година и положителни стойности за IgG при 95% от изследваните [174]. 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 [175]. 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 [176].

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. В нашето проучване не установихме сигнификантна корелация между наличието на хоспитализация и стойностите на IgG, но следва да отбележим, че броят на хоспитализираните участници е по-малък – 4 от 46 пациенти. В други проучвания обаче, се установява положителна връзка между хоспитализацията и стойностите на IgG. Едно от тях е споменатото проучване от Исландия, където се показва посилен имунен отговор при хоспитализирани пациенти и тези с по-тежка клинична картина [169]. 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 [82]. По-ниски стойности на IgG и по-бърз спад при амбулаторните, съпоставени с хоспитализирани пациенти съобщават Roltgen и колектив [177]. По-високите стойности в ранната реконвалесцентна фаза се установяват и в друго изследване, което сравнява нехоспитализирани и

хоспитализирани с тежка форма на боледуване, но в него се посочва изравняване на стойностите след 6-9 месеца от началото на инфекцията [178].

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 [179, 175].

### **I.5.2. Антитела от клас IgA срещу Spike протеина**

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. При някои пациенти с високи стойности на IgA наблюдавахме по-ниски от средните резултати на IgG и обратно – високите титри на IgG при някои пациенти бяха измерени на фона на ниски и отрицателни стойности на IgA. Въпреки това нашият анализ показва значителна корелация ( $R=0.68$ ) между получените резултати за IgG и IgA, което показва, че с голяма сигурност при високи стойности на IgG може да очакваме и високи стойности на IgA.

Докато повечето проучвания показват сходна динамика в IgA по време на инфекция и в ранния реконвалесцентен период, резултатите от по-продължителните проследявания са противоречиви. Антителата от клас IgA могат да бъдат засечени в серума на болните след 7-14 дни, обикновено след появата на IgM, но понякога и успоредно с нея. Освен това те се посочват като основен компонент в ранния вируснеутрализиращ имунен отговор [180]. 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 [168]. По-усилен спад в сравнение с IgG и 19% положителни индивиди след 12 месеца посочват Gluck и колектив в тяхното обсервационно изследване [176]. Близки до тези резултати са показани и в няколко други проучвания [85], [181],

[182]. 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. При 217 пациенти, изследвани 28-142 ден от поставяне на диагнозата, се установяват 83.4% положителни за IgA [171]. 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 [173,183].

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 [169, 177, 184].

### **I.5.3. Вируснеутрализиращи антитела**

Стабилност във вируснеутрализиращия потенциал до 1 година от боледуване констатирахме в нашето изследване, което съвпада и с изложените резултати за IgG и IgA. Не се наблюдава спад в максималните резултати, а средните стойности показваха понижение от 12.76% между период I и III, като основно такъв беше наблюдаван в първите 7 месеца от началото на инфекцията (10.83%). 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 [178, 185]. Публикувани са обаче и няколко изследвания, при които данните са малко по-различни. Например Wang и колектив установяват спад от 34.8% при проследяване на 30 индивиди в първите 3 месеца, който е по-голям от показания при нас 10.83% [186]. От 349 симптоматични пациенти 70% са положителни за VNAb след 6 месеца, което е по-малко от получените от нас средно 88.8% (85%-92.6%) [187]. 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 обаче 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 [105, 177, 178, 188, 189].

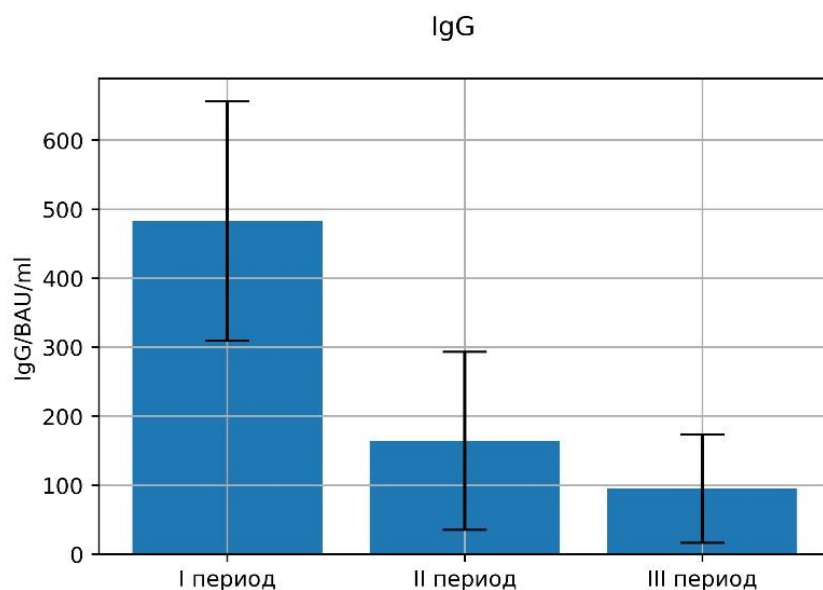
## **Раздел II ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ПРИ ВАКСИНИРАНИ**

### **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. Период I – от 30-тия до 90-тия ден след завършване на ваксинационния курс, период II – от 91-вия до 210-тия ден и период III – от 211-тия до 360-тия ден. 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. При този участник стойностите на IgG за другите два периода са били съответно: 394.605 BAU/ml и 30.495 BAU/ml. На фигура 12 е представена динамиката на средните стойности на IgG по периоди.



*Фигура 12. Средни стойности на антителата от клас IgG при ваксинирани неболедували в период I, II и III.*

От графиката се вижда по-малка неопределеност в сравнение с данните за IgG при преболедували. Тоест при ваксинираните пациенти диапазонът на данните е по-близо до средните стойности. 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

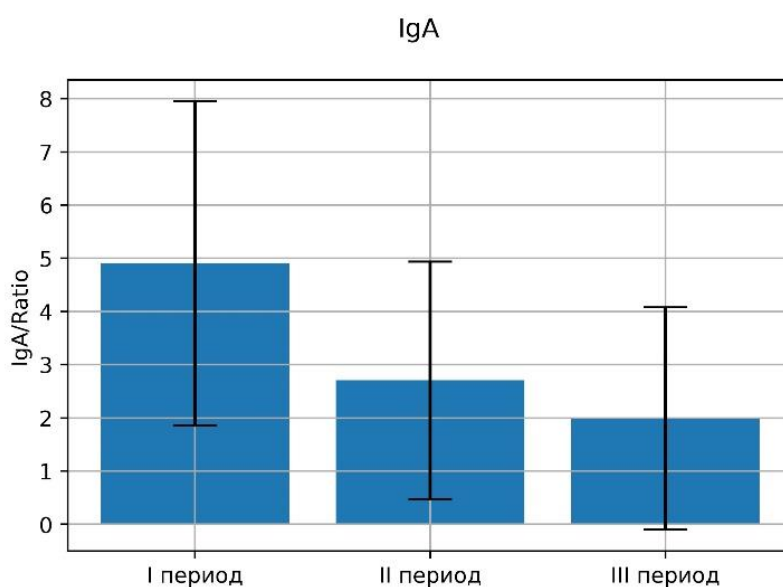
<b>No период vs No период</b>	<b>p-value</b>	<b>Спадане в %</b>
I vs II	0.0001	66
II vs III	0.018	42.02
I vs III		80.28

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, като той е 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, при когото стойността на IgG е 257.151 BAU/ml, т.е. под средната стойност за този период. Отрицателен е бил резултатът и при измерване, направено във втори период, когато стойността на IgG е 63.023 BAU/ml. При други двама участници (7.41%) стойността на ratio попада в граничния интервал, като при тях стойностите на IgG в този период са били: 574.831 BAU/ml и 106.057 BAU/ml. И при двамата в следващия период ratio е отрицателно, а резултатите за IgG са съответно: 111.816 BAU/ml и 39.237 BAU/ml. За период II са налични данни относно 29 работници. При 7 от тях (7/29) стойностите са отрицателни. При един от тях стойността на ratio за период I е 6.19, което е над средното за съответния период. При всички 7 негативни за IgA, стойностите на IgG за период II са под средните (164.2 BAU/ml). При други 4-ма участници (4/29) ratio е в граничния интервал, като при тях IgG е: 100.837 BAU/ml, 209.196 BAU/ml, 98.601 BAU/ml и 67.089

BAU/ml. При 3-ма от тях са налични данни за IgA в период I, когато ratio е с положителна стойност. В третия период са изследвани антитела от този клас при 22-ма работници. При 5 от тях резултатът е отрицателен, а при други 3-ма стойността е в граничния интервал. Само при 1 от всички 8 участници с ratio под положителната стойност IgG е над средната за периода и е 239.894 BAU/ml. При всички останали IgG е по-малко от 100 BAU/ml. Динамиката на средните стойности на IgA се представя на фигура 13. Минималните положителни, максималните и средните стойности са представени в таблица 10.



*Фигура 13. 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

Статистическият анализ на спада на IgA е представен на таблица 11.

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

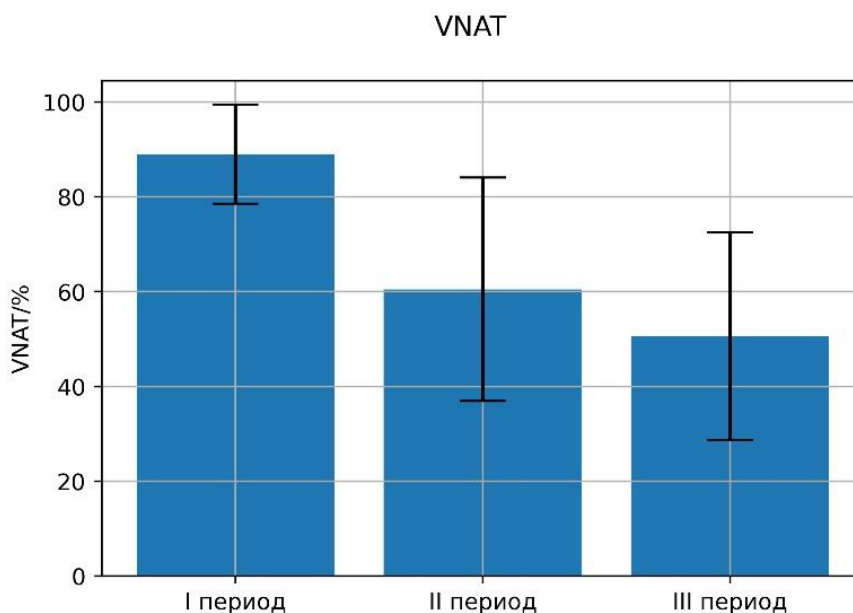
<b>No период vs No период</b>	<b>p-value</b>	<b>Спадане в %</b>
I vs II	0.004	44.81
II vs III	0.257	26.57
I vs III		59.47

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.

### **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. При 3-мата пациенти с отрицателни или гранични стойности на IgA, процентът на инхибиране е: 90.6%, 58.2%, 96.1%. В период II вирусна неутрализация е определена при 29 участници, като при трима от тях инхибирането е под 30%, т.е. резултатът е отрицателен. И при тримата IgA е с отрицателни стойности, а IgG е по-малко от 100 BAU/ml. При 27 човека е извършено изследване на вируснеутрализиращи антитела през трети период, като при 6 от тях  $I < 30\%$ . При 2-ма от тях (2/6) изследването за IgA показва ratio малко над 1.1. Всички имат положителни стойности на IgG, но само при един от тях стойността е над средната за съответния период.

На фона на изложената към момента динамика при IgA и IgG се наблюдава следния темп на вируснеутрализиращия потенциал, представен на фигура 14.



*Фигура 14. Средни стойности на процента вирусна неутрализация при ваксинирани неболедували в период I, II и III.*

Тук неопределеността в период I е по-малка, като максимално измерената стойност е 97.8%, а минималната е 58.2%. В период две и период три неопределеността се увеличава. 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:

Но период vs Но период	p-value	Спадане в %
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.

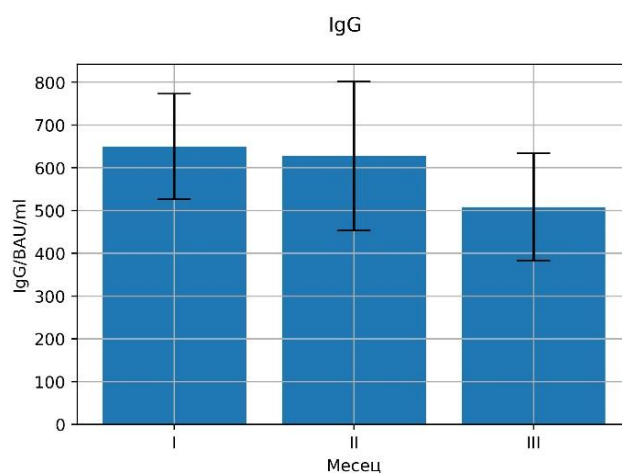
#### **II.2. Хуморален имунитет при ваксинирани с бустерна доза**

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 ваксинационния 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 (фигура 15). Максималните, минималните и средните стойности за отделните месеци са представени на таблица 13.



Фигура 15. Средни стойности на IgG през месец 1, 2 и 3 след поставяне на бустерна доза

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

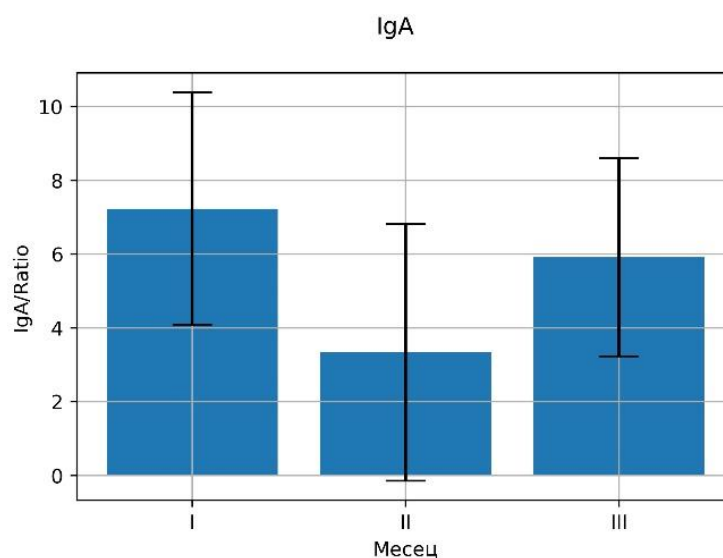
Месец	Минимална стойност/ BAU/ml	Максимална стойност/ BAU/ml	Средна стойност/ BAU/ml
Месец 1	419.001	776.403	649.71
Месец 2	384.237	784.941	627.52
Месец 3	289.5	669.264	508.42

От представените средни стойности за IgG и техните неопределености не се наблюдава значително намаляване на стойностите за първите 3 месеца.

От статистическия анализ също не се установява значителна разлика между първите три месеца. Възможно е обаче в последващите месеци да настъпи такава, защото се наблюдава понижаване на  $p$  – value от 0.862 между месец 1 и 2 до 0.332 между месец 2 и 3. Процентът на спад между отделните периоди е както следва: между месец 1 и 2 – 3.42%, между месец 2 и 3 – 18.98% и между месец 1 и 3 – 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 в хода на проследяване е 10.35 ( $R=10.35$ ) в месец 1, а в месец 3 – максималният резултат е 10 ( $R=10$ ). На фигура 16 е показана динамиката на средните стойности.



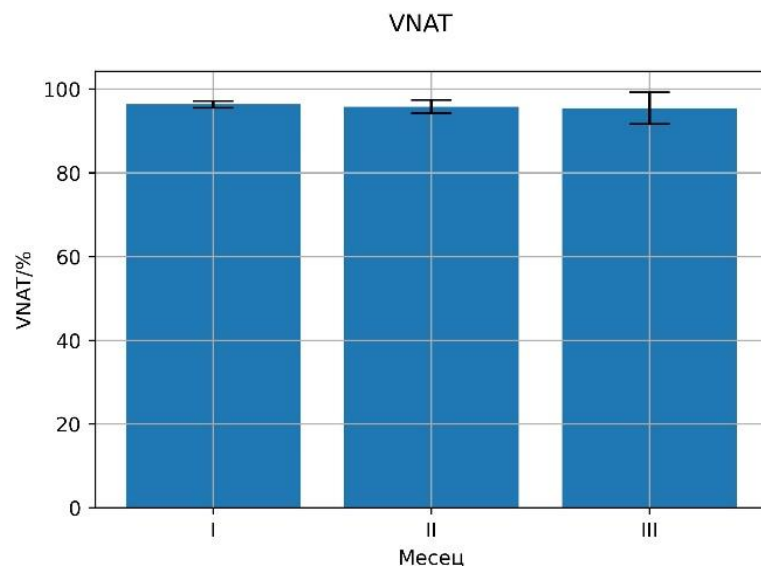
Фигура 16. Средни стойности на IgA през месец 1, 2 и 3 след поставяне на бустерна доза

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 инхибиция е изчислен при всички с изключение на един участник в месец 2 (фигура 17). Минимално измерената стойност за целия период на проследяване е 88% в месец 3. От графиката се вижда, че на фона на много малка неопределеност (данните са силни концентрирани в малък диапазон) не се наблюдава промяна в средните стойности на процента вируснеутрализиращ потенциал.



Фигура 17. 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

Направихме статистически анализ за IgG между първите три месеца след завършване на ваксинационния курс и след поставяне на бустерна доза. Данните за средните стойности (в ВАU/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. Въпреки малко по-високите средни стойности след поставяне на бустерната доза, 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 VNAb 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

### **II.4. Обсъждане**

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. Интересно е да се отбележи, че в период III максимално измерените стойности на IgA (R=9,8 и R=5,16) са на фона на много ниски резултати за IgG, съответно 38.627 BAU/ml и 32.528 BAU/ml.

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 >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 [190]. При други 300 проследени здравни работници до третия месец от завършване на ваксинационния курс се наблюдава 99.3% серопозитивност за IgG и вируснеутрализиращи антитела [191]. 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

вакцинационния курс, като след това такава зависимост не се наблюдава [192]. 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 [193]. Освен в нашето, в още едно изследване, получените резултати предполагат по-бавен темп на спад след шестия месец [194]. Много по-малко от нас положителни за вируснеутрализиращи антитела посочват Bayart и колектив, 6 месеца след ваксинация – 45% [195]. 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 [196].

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 [190, 197]. 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 [198]. 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.

В нашето проучване не бяха включени участници, ваксинирани с векторна ваксина. Разлики в имунния отговор при индивиди, при които е приложена векторна или иРНК ваксина са наблюдавани от някои автори. При изследване на 605 серума от ваксинирани с BNT162b2 и ChAdOx1, Shrotr и колектив установяват по-високи средни стойности на IgG при ваксинираните с иРНК-ова ваксина както при преболедували, така и при неболедували преди

вакцинацията участници. Спад е наблюдаван при всички участници, но той е много по-силно изразен при получилите векторна ваксина [199]. Разлика се наблюдава и при стимулиране синтеза на антитела от клас IgA, като се показва 100% положителни индивиди в първия месец след поставяне на втората доза за РНК-ваксината на Pfizer и 67% при векторната ваксина [198]. Близки до тези са и заключенията на други автори, които посочват също и по-добра ефективност на препарата на Pfizer/BioNTech при по-възрастни пациенти [200]. При сравнение на двете иРНК ваксини в едно проучване се посочва 100% индукция на имунен отговор при всички участници, но по-високи средни стойности при тези, при които е приложена mRNA1273 ваксината на Moderna [201]. При друго, което проследява 47 индивиди, разлика между стойностите на антителата се наблюдава само след поставяне на една доза, но не и при завършване на ваксинационния курс, като отново по-високи са резултатите при поставяне продукта на Moderna [202]. Установеният процент на ефективност, 5 месеца след ваксинация, е най-висок за mRNA-1273 (84.3%) и най-нисък за ChAdOx1 (75.7%), при обсервационно проучване на над 600 000 човека в Обединеното кралство [203]. По-бърз спад – 28.8% на месец за BNT162b2, сравнено с 25.5% за mRNA-1273 посочват Wu и колектив [204]. В нашето проучване не беше направена оценка за разлика в имунния отговор при двете иРНК ваксини.

Ние открихме положителна корелация между стойностите на IgG и IgA и между тези на IgG и VNAб. Висока корелация между IgG и VNAб се посочва и в други изследвания и някои автори предполагат, че по нивото на IgG може да се направят изводи и за вируснеутрализиращия потенциал [196, 205, 206, 207].

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 [200, 202, 204, 208, 209]. Други автори посочват силен имунен отговор при всички възрасти, но по-ниски 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 [190, 210 - 215].

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 [190, 217]. 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 [190].

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. При 9 участници стойностите на IgG са били по-високи след бустерната доза, независимо от месеца на измерване, в сравнение с максималните пикови концентрации след завършване на редовния ваксинационен курс. За IgA и VNAb данните са разнопосочни и не може да се направи оценка, но средните стойности за месеците са по-високи в сравнение със същите при двудозовия режим на ваксинация.

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. В тяхното проучване е поставен иРНК препарат при всички ваксинации [218]. 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 [209]. 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 [219]. Хетероложната ваксинация също показва по-високи стойности на антителата сравнено с хомоложната, проведена с векторна ваксина, и добра неутрализираща активност към различни варианти на вируса. Изследвани са пациенти, при които е поставена ваксината на Pfizer/BioNTech след провеждане на ваксинационен курс с препарата на Janssen/Johnson&Johnson или този на AstraZeneca/Oxford [220, 221, 222]. 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) [223, 224]. В своето изследване Wu и колектив посочват, че вируснеутрализиращата активност спрямо Omicron след третата доза е близка до тази срещу Delta след втора доза [225]. Въпреки наблюдаваната понижена активност, наблюдационно проучване в Израел показва по-малка честота на инфекциите и хоспитализациите при ваксинираните с бустерна доза индивиди над 60 години [226].

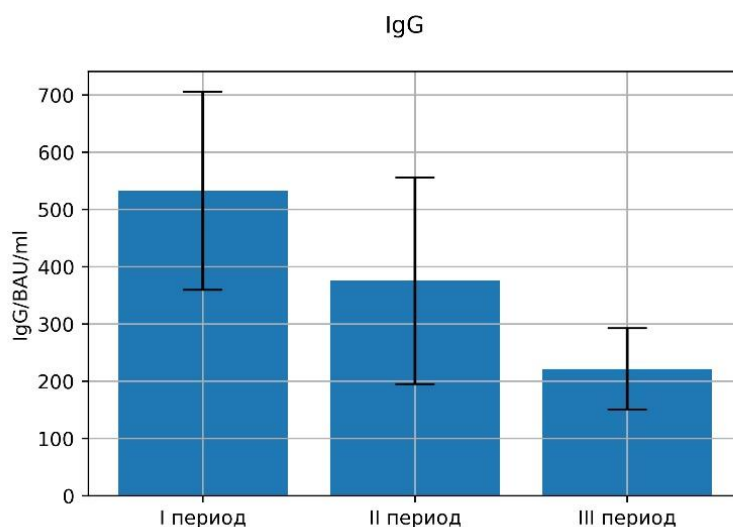
## Раздел III ХИБРИДЕН ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР

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

В нашето проучване е проследен и хуморалният имунен отговор при част от преболедушвалите работници, които в последствие са били ваксинирани. От включените в изследването 103 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 информацията 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 18. Максималните, минималните и средните стойности са представени на таблица 17.



Фигура 18. 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, 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:

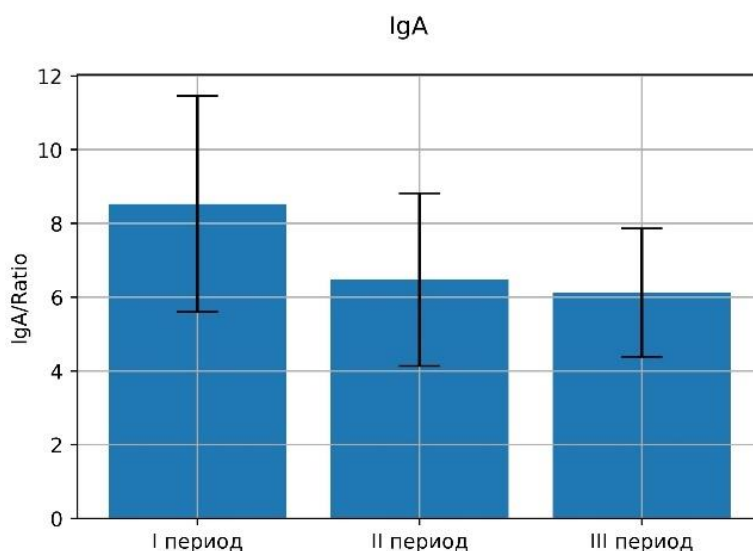
No период vs No период	p-value	Спадане в %
I vs II	0.04	29.52
II vs III	0.053	40.95
I vs III		58.39

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 19 е представена динамиката в средните стойности на IgA за трите периода. Максималните, минимални и средни стойности са представени на таблица 19.



Фигура 19. 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 стойности 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.

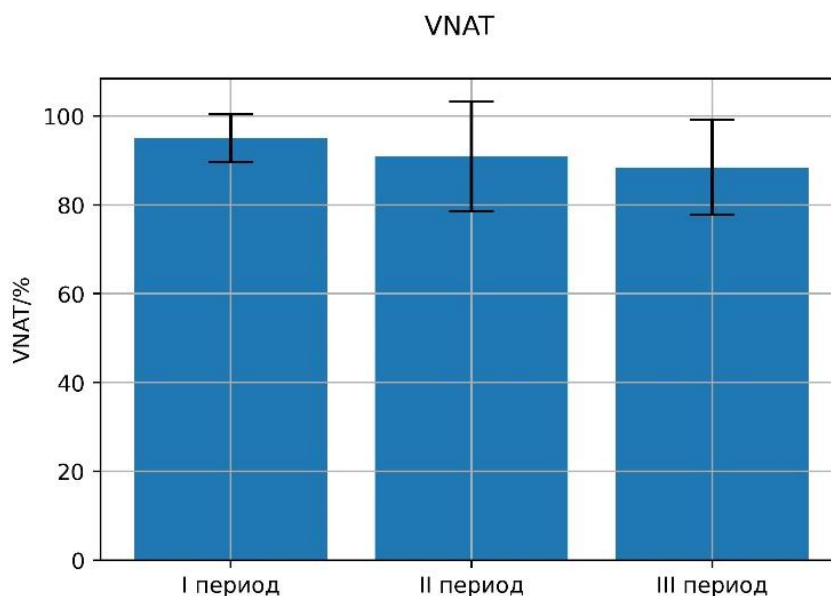
*Таблица 20: Резултати, получени при статистическия анализ между средните стойности на IgG в трите периода при индивиди с хибриден хуморален имунитет, изразени чрез p-value и процент на спад:*

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

Не се открива статистически значима разлика между отделните периоди и процентът на спад е по-нисък в сравнение с IgG при преболедали и ваксинирани. 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.

### **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 20.



*Фигура 20. Средни стойности на процента вирусна инхибиция при ваксиниране след боледуване в период I, II и III.*

Тук неопределеността е малка и във всички периоди диапазонът на данните е по-малък и е около средната стойност. На таблица 21 са дадени стойностите за различните периоди.

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

Период	Минимална стойност	Максимална стойност	Средна стойност
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%.

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

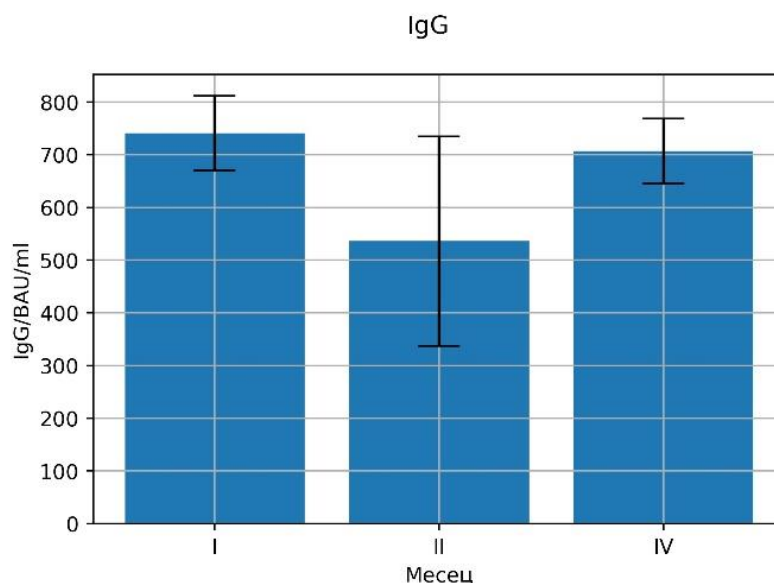
При изследвания на корелационния коефициент на Pearson между стойностите на антителата в период I с възрастта и наличие на поствакцинални реакции, наблюдавахме следните зависимости. Значителна отрицателна корелация ( $R = -0.67$ ,  $p = 0.024$ ) установихме между стойностите на IgA и възрастта, т.е. по-ниски стойности бяха констатирани при покачване на възрастта. Относно поствакциналните 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 имунен 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 21.



Фигура 21. 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 около 9 ( $R \approx 9$ ), 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 инхибиция) 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 VNAbs 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. Не установихме 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 ( $R=0.99$ ,  $p=0.031$ ).

От изложените данни се вижда, че както при само преболедувалите, така и при боледувалите на фона на ваксинация, се установява правопрпорционална връзка между стойностите на изследваните параметри и начина на протичане на заболяването, като тук основен фактор е наличието на усложнения.

### **III.3. Обсъждане**

Като хибриден се обозначава имунитет, придобит от инфекция и ваксинация без значение от реда на поява на събитието [227].

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 инхибиция. 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 VNAб бяха около и над 90%. Повечето проучвания при преболедували пациенти, които след това са ваксинирани, са направени при едnodозов режим за двете иРНК ваксини или поставяне на една доза от ваксината Ad.26.Cov2. Те показват имунен 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 имунен отговор с висок потенциал повече от 10 месеца след боледуване [228]. Стойностите на антителата след една доза са съпоставими с тези на ваксинирани и неболедували след две дози. След поставяне на втората доза не се наблюдава повишаване на антителата или промяна в процента на вирусна инхибиция при преболедувалите [157, 229, 230].

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 ваксинация, се откриват по-ниски

стойности на антителата при ваксинираните, но неболедували индивиди [228]. Имунен отговор с голям потенциал и продължителност се открива и при 6-месечно проследяване на 123 ваксинирани след инфекция от SARS-CoV-2. В това проучване са показани по-високи стойности на IgG, IgA срещу RBD-участъка и по-голям процент на инхибиране взаимодействието с ACE2 рецептора в сравнение със само ваксинирани. Освен това не се наблюдава значителен спад за посочения период [231]. 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 преболедували показват стойности над cut-off value. Освен това средните положителни стойности в първата група са по-ниски от тези във втората за същия период [232]. 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) [211]. Всички 1754 участници се били с положителни резултати за споменатите параметри на хуморалния имунен 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 преболедували и ваксинирани и само ваксинирани, което е в противоречие с направените от нас и повечето други автори изводи [233].

Нашият анализ показва значителна отрицателна корелация между възрастта и стойностите на IgA, но не открихме такава зависимост за IgG и VNAbs. 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 [210, 234]. Нашите резултати показаха, че при по-продължителни постваксинални реакции след първа доза се образуват повече антитела от клас IgG, а наличието на обща симптоматика след първата доза, корелира с по-високи стойности на IgA. Други проучвания посочват, че по-често се наблюдават поставаксинални 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 [190, 217, 235].

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 [236]. 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“ [237].

В хода на проучването беше изследван имунният отговор при 9 участници, при които настъпи инфекция от SARS-CoV-2 след ваксиниране. Те бяха проследени за период от три месеца и при 8 от тях наблюдавахме много високи стойности на антителата от клас IgG, IgA и висок процент на инхибиране на вируса. Само при един пациент имунният отговор наподобяваше този на преболедувалите. 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. При трима от тях са измерени антителата до 3 месеца преди боледуването, като стойностите на IgG са били съответно 74.611 BAU/ml, 84.776 BAU/ml и 100.438 BAU/ml. 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, и както споменахме, при пациентът с едномесечен интервал между ваксинация и боледуване, резултатът за IgG е бил отрицателен. Всички „пробивни инфекции“ са били симптоматични, като 4 пациенти съобщават за 0-3 симптома и не съобщават за усложнения, а 5 за повече от 3 симптома и наличие на усложнения. Инфекциите са възникнали в периода август 2021-януари 2022, когато в Европа и България бяха разпространени вариантите Delta и Omicron на SARS-CoV-2.

Имунният 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, свързването 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) [238, 239, 240, 241]. 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 [242].

Така описаният имунен отговор е налице предимно при симптоматични форми на боледуване и е по-слаб при асимптоматичните [238]. Чрез определяне коефициента на Pearson ние установихме положителна корелация между продължителността на симптомите и стойностите на вируснеутрализиращи антитела.

Според някои автори вариантът Omicron е по-слабо имуногенен. Те показват по-слабо повишаване в стойностите на антителата и по-малка кръстосана реактивност на вируснеутрализиращите антитела, сравнено с тези, придобити от „пробивна инфекция“ с варианта Delta (B.1.617.2) [243, 244].

В своето проучване Dimeglio и колеги показват, че вариантът Omicron е способен да инфектира при много по-високи стойности на антителата в сравнение с Delta псевдовирусът [245]. За периода на нашето проследяване при един участник, при който е установена „пробивна инфекция“ през октомври 2021г., настъпи повторно боледуване през януари 2022г. Интересно е, че при първото боледуване на този участник симптомите бяха по-малко и по-краткотрайни в сравнение с второто. Втората инфекция настъпи при следните стойности на антителата: за IgG – 735.336 BAU/ml, за IgA R = 9.43 и вирусна инхибиция I = 97.7%.

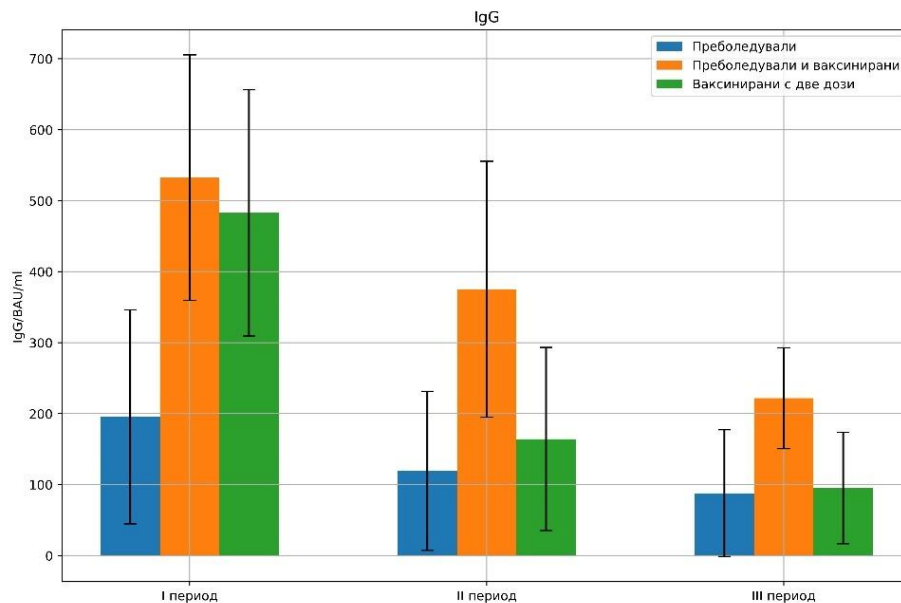
Едно изследване сравнява имунния отговор при 62 участници с хибриден имунитет, по 31 във всяка група в зависимост от последователността на събитията и не показва разлика в имунния отговор между тях [246].

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 22 са представени средните стойности на трите групи пациенти: преболедували, ваксинирани с две дози и преболедували и ваксинирани.



Фигура 22. Средни стойности на антителата от клас IgG при преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани след боледуване в период I, II и III

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:

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

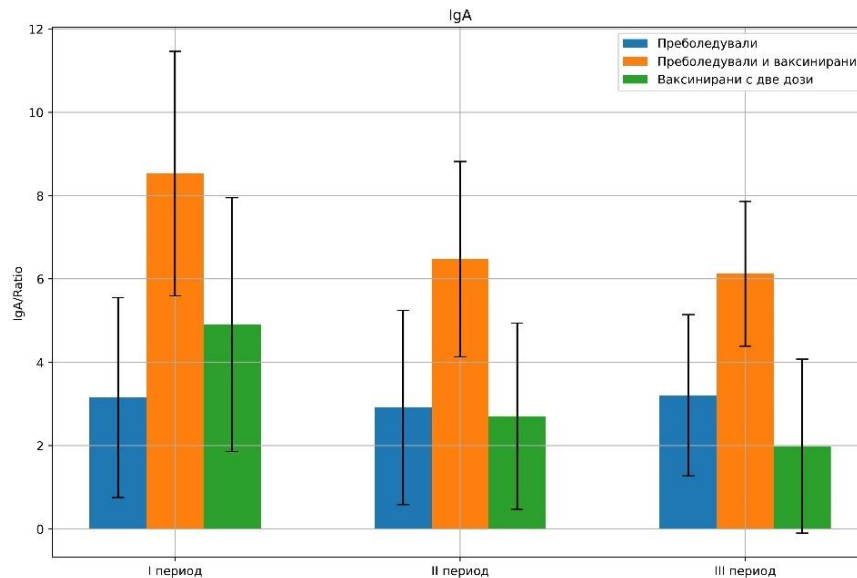
	Период I	Период II	Период III
Преболедували <b>vs</b> Преболедували и ваксинирани	0.0001	0.0001	0.001
Преболедували <b>vs</b> Ваксинирани	0.0001	0.129	0.745
Преболедували и ваксинирани <b>vs</b> Ваксинирани	0.39	0.0001	0.001

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 23.



Фигура 23. Средни стойности на антителата от клас IgA при преболедували, ваксинирани неболедували и ваксинирани след боледуване в период I, II и III

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:

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 <b>vs</b> Преболедували и ваксинирани	0.0001	0.0001	0.002
Преболедували <b>vs</b> Ваксинирани	0.043	0.736	0.05
Преболедували и ваксинирани <b>vs</b> Ваксинирани	0.002	0.0001	0.0001

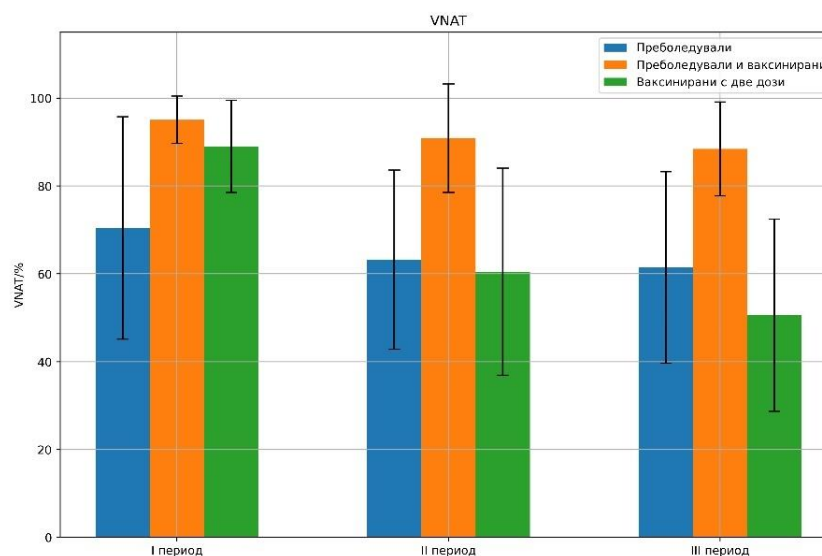
От стойностите на p-value се наблюдават следните зависимости: между групата на преболедували и тази на преболедували и ваксинирани се установява статистически значима разлика за трите периода. В период III се наблюдава повишение на p-value, което е резултат от липсата на спад на IgA при преболедували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

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.

#### IV.3. Сравнение на вируснеутрализиращите антитела

Сравнението на вируснеутрализиращия потенциал във всички периоди за трите групи пациенти е показано на фигура 24.



Фигура 24. Средни стойности на процента вирусна инхибиция 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 vs Преболедували и ваксинирани	0.003	0.0001	0.005
Преболедували vs Ваксинирани	0.001	0.65	0.089
Преболедували и ваксинирани vs Ваксинирани	0.071	0.0001	0.0001

Между преболедувалите и преболедувалите и след това ваксинирали 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.

#### **IV.4. Обсъждане**

Нашите резултати показаха следните разлики в стойностите и динамиката на антителата при само преболедували и при само ваксинирани пациенти: през първите до 4 месеца средните стойности на IgG, IgA и процентът вирусна неутрализация са по-високи в групата на ваксинираните. Поради по-усиления спад при тях след 4-тия месец започва изравняване в стойностите между двете групи. В период III – 8 месеца след събитието, при преболедували са малко по-високи стойностите на IgA и VNAb, а за IgG средният резултат е почти равен при двете групи пациенти. Данните обаче показаха, че ваксинирането след преболедуване увеличава значително концентрациите на антителата и имунитетът, придобит по този начин, е стабилен във времето. Голяма разлика се установи и при трите изследвани антитела във всички периоди от време. Това показва, че при преболедували пациенти ваксинацията е желателна и води до по-дълготраен имунен отговор с по-голям потенциал. При сравнение между само ваксинирани участници и тези, които са преболедували и след това са ваксинирани, открихме, че за IgG и VNAb пиковите стойности (тези в период I) са близки, но при втората група спадът е по-малък и високи стойности се измерват дори и след 8-12 месеца. За IgA обаче още в период I резултатите са значително по-високи при индивидите с хибриден хуморален имунитет, като при тях се измерват и много

високи максимални концентрации. Този клас антитела също показват стабилност и остават високи дори и след 8-мия месец от поставянето на втората доза.

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 [247]. В своето изследване Perez-Alos и колектив посочват също значително по-високи концентрации на IgA , IgG и VNAб при участниците с хибриден имунен отговор в сравнение с ваксинираните и по-малък спад за периода на проследяване – 230 дни [211]. По-високи пикови стойности при ваксинирани, но липса на разлика в резултатите между ваксинирани и преболедували след 6 месеца е констатирано в друго изследване [206]. Получените от нас резултати при сравнение на трите групи пациенти се посочват в още едно голямо изследване, което обхваща общо 1081 участници [248]. 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 [249].

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 [233].

В научната общност остава въпросът дали потенциалът и продължителността на имунния отговор зависят от начина на придобиването му (преболедуване, 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 [239]. Същото е наблюдението, направено в още едно проучване върху 173 индивиди [250].

За периода на нашето проучване настъпиха определен брой реинфекции и пробивни инфекции. Информацията за това е получена от медицинската документация и са включени само индивиди с доказан RT-PCR или антигенен тест. В групата на преболедувалите участници 13/48 са преболедували втори път, т.е. честотата на реинфекции е 27.1%. При 20 от 53 ваксинирани с две дози е настъпила пробивна инфекция – 37.7%. В групата на участниците, които са преболедували и след това ваксинирани, при 8 от 63 (12.7%) е настъпила повторно инфекция. От 41 работници с поставена бустерна доза при 5 се наблюдава пробивна инфекция – 12.20%. Така процентът на пробивни и реинфекции корелира с направените до момента заключения относно продължителността и потенциала на имунния отговор и показва, че при три експозиции към вируса рискът от заразяване е почти един и същ. Всички реинфекции и пробивни инфекции са настъпили в периода 09.2021г. – 03.2022г., когато в България и Европа доминиращи бяха вариантите Delta и Omicron на SARS-CoV-2. Такива наблюдавахме дори и при стойности на антителата над средните за съответния период и при висок процент на вируснеутрализираща активност.

## 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 ваксина, 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 VNAb. В настоящето проучване стойностите на изследваните антитела при ваксинираните и непреболедували бяха значително по-високи от тези при преболедували в първите 3 месеца, но тук също беше констатиран по-усилен спад, като процентът на понижаване в средните стойности между период I и III беше 80.28% за IgG, 59.47% за IgA и 43.17% за VNab. Така след седмия месец стойностите при само ваксинирани бяха близки до тези на само преболедувалите.

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 като понижаването в средните стойности на антителата между период I и период III при тази група беше 58.31% за IgG, 28.25% за IgA и 7% заVNAb. В резултат на този по-бавен темп на спад, 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 VNAb, 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.

При сравнение в динамиката на трите параметъра между групите на преболедували, ваксинирани и преболедували и ваксинирани серонаивни установихме следните зависимости. В първите три месеца след ваксиниране, без значение от наличие на предишна експозиция към вируса, се установяват значително по-високи стойности на IgG и VNAb в сравнение с преболедувалите индивиди. В този период стойностите на IgG и VNAb между двете групи ваксинирани участници – преболедували и непреболедували, не се различават значително. Поради по-силния спад в групата на ваксинирани серонаивни, след третия месец и до края на проучването се установяват значимо по-ниски стойности на IgG и VNAb в сравнение с индивидите с хибриден хуморален имунитет. По-силният спад при само ваксинираните в

сравнение със само преболедувалите води до липса на значима разлика в стойностите между двете групи след 4-тия месец.

При антителата от клас IgA не беше установена промяна в средните стойности при преболедувалите за целия период на проследяване. За разлика от IgG и VNAb, за IgA значимо по-високи стойности в групата на ваксинирани и преболедували в сравнение с групата на ваксинирани серонаивни бяха установени още в първите 1-3 месеца след ваксинация. Освен това при индивидите с хибриден хуморален имунитет бяха измерени най-високите стойности на IgA. Поради разликите в динамиката на IgA между индивиди, които са били инфектирани със SARS-CoV-2, и тези които са придобили имунитета си само чрез ваксина, след 7-мия месец при преболедувалите се наблюдават значително по-високи стойности на IgA в сравнение с ваксинираните серонаивни. Причините за по-високите стойности на IgA след инфекция и липсата на спад в средните стойности при преболедували, не са напълно изяснени. Към научната общност остава също въпроса дали броя на срещите с антигена са причина за по-силния и по-стабилен имунитет при ваксинирани и преболедували или причината е различния начин на придобиването му.

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.

## 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 VNAb 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 .

## **СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ:**

### ТЕОРЕТИЧНИ

1. Проследяването на хуморалния имунен отговор при преболедували лица показва динамиката на антителата от клас IgG, IgA и VNAb 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 открои 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.

### 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 използване 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.

## Библиография:

1. Corman VM, Muth D, Niemeyer D et al. *Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses*. *Adv Virus Res*. 2018; 100: 163–188
2. Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J et al. *Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences*. *J Virol*. 2010; 84(21): 11336–11349
3. Zaki AM, Boheemen S, Bestebroer TM et al. *Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia*. *N Engl J Med*. 2012; 367(19):1814-20
4. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it, <https://www.who.int>
5. Hu B, Guo H, Zhou P et al. *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19*. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):141-154
6. Kyriakidis NC, Lopez-Cortez A, Gonzalez EV et al. *SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates*. *NPJ Vaccines*. 2021; 6(1):28
7. Suryawanshi R, Ott M, *SARS-CoV-2 hybrid immunity: silver bullet or silver lining?* *Nat Rev Immunol*. 2022
8. Yatim KM, Lakkis FG, *A brief journey through the immune system*. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10(7):1274-81
9. Wood P. *Understanding Immunology*. London, Pearson Prentice Home, 2006, 42-54
10. Virella G. *Medical Immunology*. Charleston, South Carolina, CRC Press, 2019, 55-64
11. Bennett J., Dolin R., Blazer M. *Principles and Practice of infectious diseases*, Elsevier, 2019, 38-45
12. Virella G. *Medical Immunology*. Charleston, South Carolina, CRC Press, 2019, 65-72
13. Nossal GJ, *Kinetics of antibody formation and regulatory aspects of immunity*. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1975; 194: 96-116
14. Wood P. *Understanding Immunology*. London, Pearson Prentice Home, 2006, 141-144
15. Murphy K., Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. New York, Garland Science, 2016, 399-400
16. Zinkernagel RM, LaMarre A, Ciurea A et al. *Neutralizing antiviral antibody responses*. *Adv Immunol*. 2001; 79:1-53

17. Cooper NR, Nemerow GR, *The Role of Antibody and Complement in the Control of Viral Infections*. J Invest Dermatol. 1984; 83(1): 121-127
18. Dörner T, Radbruch A, *Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity*. Immunity. 2007; 27(3) :384-92
19. Ali MG, Zhang Z, Gao Q et al. *Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview*. Immunol Res. 2020; 68(6): 325-339
20. Channappanavar R, Perlman S, *Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology*. Semin Immunopathol. 2017; 39(5):529-539
21. Perlman S, Dandekar AA, *Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS*. Nat Rev Immunol. 2005; 5(12): 917-27
22. Nie Y, Wang G, Shi X et al. *NABs against severe acute respiratory syndrome*. J Infect Dis. 2004; 190(6): 1119-26
23. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI et al. *The proximal origin of SARS-CoV-2*. Nat Med. 2020; 26(4): 450-452
24. Kadam SB, Sukhramani G, Bishnoi P et al. *SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights*. J Basic Microbiol. 2021; 61(3): 180-202
25. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A et al. *COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis*. J Gene Med. 2021; 23(2): e3303
26. Ke Z, Oton J, Qu K et al. *Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions*. Nature, 2020; 588: 498–502
27. Lan J, Ge J, Yu J et al. *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor*. Nature, 2020; 581: 215–220
28. Yao H, Song Y, Chen Y et al. *Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus*. Cell. 2020; 183(3): 730-738
29. Wilson L, McKinlay C, Gage P, Ewart G. *SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels*. Virology, 2004; 330(1): 322-31
30. De Haan C, Vennema H, Rottier P. *Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins*. J Virol, 2000; 74(11): 4967-78
31. Fang X, Gao J, Zheng H et al. *The membrane protein of SARS-CoV suppresses NF- $\kappa$ B activation*. J Med Virol. 2007; 79(10): 1431-39
32. Holmes E, Goldstein S, Rasmussen A et al. *The origins of SARS-CoV-2: A critical review*. Cell. 2021; 184(19): 4848-56

33. Ramesh S, Govindarajulu M, Parise RS et al. *Emerging SARS-CoV-2 Variants: A Review of Its Mutations, Its Implications and Vaccine Efficacy*. Vaccines (Basel). 2021; 9(10): 1195
34. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions, CDC, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
35. Janik E, Niemcewicz M, Podogrocki M et al. *The Emerging Concern and Interest SARS-CoV-2 Variants*. Pathogens. 2021; 10(6) :633
36. Singh DD, Parveen A, Yadav DK, *SARS-CoV-2: Emergence of New Variants and Effectiveness of Vaccines*. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11:777212
37. Chen J, Wang R, Gilby NB et al. *Omicron (B.1.1.529): Infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance*. J Chem Inf Model. 2022; 62(2): 412-422
38. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor*. Cell, 181(2): 271-280
39. Qiao J, Li W, Bao J et al. *The expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and CD147, and protease TMPRSS2 in human and mouse brain cells and mouse brain tissues*. Biochem Biophys Res Commun. 2020; 533(4): 867–871
40. Gkogkou E, Barnasas G, Vougas K, Trougakos I. *Expression profiling meta-analysis of ACE2 and TMPRSS2, the putative anti-inflammatory receptor and priming protease of SARS-Cov-2 in human cells, and identification of putative modulators*, Redox Biol. 2020; 36:101615
41. Zhou Z, Kang H, Li S, Zhao X. *Understanding the neurotropic characteristics of SARS-CoV-2: from neurological manifestations of COVID-19 to potential neurotropic mechanisms*. J Neurol. 2020; 267(8): 2179-84
42. Perico L, Benigni A, Casiraghi F et al. *Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19*. Nature, 2021, Nat Rev Nephrol, 17(1): 46-64
43. Brodin P. *Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity*. Nat Med. 2021, 27: 28–33
44. Triggler C, Bansal D, Ding H et al. *A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic*. Front Immunol. 2021; 12: 631139
45. Vabret N, Britton G, Gruber C et al. *Immunology of COVID-19: current state of the science*. Immunity. 2021; 52(6): 910-941
46. Yang Li, Liu S, Liu J et al. *COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics*. Transduct Target Ther. 2020; 5(128)

47. Eddie Ip W, Chan K, Law H et al. *Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection*. J Infect Dis, 2005; 191(10): 1697-704
48. Gao T, Hu M, Zhang X et al. *Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation*. Signal Transduct Target Ther. 2022; 7(1):318.
49. Gralinski L, Sheahan T, Morrison T et al. *Complement Activation Contributes to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pathogenesis*. mBio. 2018; 9(5): e01753-18
50. Magro C, Mulvey J, Berlin D et al. *Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases*. Transl Res, 2020; 220: 1-13
51. Lee MJ, Blish CA. *Defining the role of natural killer cells in COVID-19*. Nat Immunol.2023; 24: 1628–1638
52. Marquardt N, Kekäläinen E, Chen P et al. *Unique Transcriptional and Protein-Expression Signature in Human Lung Tissue-Resident Nk Cells*. Nat Commun. 2019; 10: 3841
53. Krämer B, Knoll R, Bonaguro L et al. *Early IFN-alpha signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19*. Immunity. 2021; 54(11):2650-2669
54. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L et al. *Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent*. J Clin Invest. 2020; 130(9): 4694–4703
55. Hsieh W, Lai E, Liu Y et al. *Nk Cell Receptor and Ligand Composition Influences the Clearance of Sars-Cov-2*. J Clin Invest. 2021; 131(21)
56. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez S et al. *Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals*. Cell. 2020; 181(7): 1489-1501
57. Velikova T, Kotsev S, Georgiev D et al. *Immunological aspects of COVID-19: What do we know?* World J Biol Chem. 2020; 11(2):14-29
58. Sette A, Crotty S. *Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19*. Cell. 2021; 184(4): 861–880
59. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O et al. *Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19*. Cell. 2020; 183(1): 158-168
60. Diao B, Wang C, Tan Y et al. *Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. Front Immunol. 2020; 11: 827

61. Huang C, Wang Y, Li X et al. *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan*. The Lancet, 2020; 395 (10223):497-506
62. Lu W, Mehraj V, Vyboh K et al. *CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients*. J Int AIDS Soc. 2015; 18(1): 20052
63. Kurteva E, Vasilev G, Tumangelova – Yuzeir K et al. *Interferon-gamma release assays outcomes in healthy subjects following BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination*. Rheumatol Int. 2022; 42(3): 449-456
64. Khosroshahi L, Rokni M, Mokhtari T, Noorbakhsh F. *Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview*. Int Immunopharmacol. 2021; 93:107364
65. Wang B, Wang L, Kong X et al. *Long-term coexistence of SARS-CoV-2 with antibody response in COVID-19 patients*. J Med Virol. 2020; 92(9): 1684-89
66. Guo L, Ren L, Yang S et al. *Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19)*. Clin Infect Dis. 2020; 71(15): 778-785
67. Zhang X, Lu S, Li H et al. *Viral and Antibody Kinetics of COVID-19 Patients with Different Disease Severities in Acute and Convalescent Phases: A 6-Month Follow-Up Study*. Virol Sin. 2020; 35(6): 820–829
68. Ou J, Tan M, He H et al. *SARS-CoV-2 Antibodies and Associated Factors at Different Hospitalization Time Points in 192 COVID-19 Cases*. JALM. 2021; 6(5):1133-42
69. Li K, Huang B, Wu M et al. *The Dynamic Changes of Antibodies against SARS-CoV-2 during the Infection and Recovery of COVID-19*. Nature communications, 2020; 11: 6044
70. Meyer B, Drosten C, Müller M. *Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls*. Virus Res., 2014, 194:175-83
71. Sirakusano G, Pastori C, Lopalco L. *Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients: A Window on the State of the Art*. Front Immunol. 2020; 11: 1049
72. Wu F, Wang A, Liu M et al. *Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications*. Preprint, 2020
73. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y et al. *Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France*. EbioMedicine. 2020; 59: 102915
74. Wang P, Liu L, Nair M et al. *SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses Are More Robust in Patients with Severe Disease*. Emerg Microbes Infect. 2020; 9(1): 2091-93

75. Brochot E, Demey B, Touze A et al. *Anti-Spike, anti-Nucleocapsid and neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 inpatients and asymptomatic carriers*. *Front Microbiol*. 2020; 11: 584251
76. Seow J, Graham C, Merrick B et al. *Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans*. *Nature*, 2020; 5: 1598–1607
77. Tan W, Lu Y, Zhang J et al. *Viral Kinetics and Antibody Responses in Patients with COVID-19*, preprint, 2020
78. Zhao J, Yuan Q, Wang H et al. *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019*. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(16):2027-2034
79. Kong W, Zhao R, Zhou J et al. *Serologic Response to SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients with Different Severity*. *Virol Sin*. 2020; 35(6):752-757
80. Kellam P, Barclay W, *The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection*. *J Gen Virol*. 2020; 101(8):791-797
81. Xiao T, Wang Y, Yuan J et al. *Early viral clearance and antibody kinetics of COVID-19 among asymptomatic carriers*. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8:595773
82. Long Q, Tang X, Shi Q et al. *Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infection*. *Nat Med*. 2020; 26(8): 1200-1204
83. Li K, Huang B, Wu M et al. *The Dynamic Changes of Antibodies against SARS-CoV-2 during the Infection and Recovery of COVID-19*. *Nature Communications* , 2020; 11(1)
84. Ou J, Tan M, He H et al. *Study on the expression levels of antibodies against SARS-CoV-2 at different period of disease and its related factors in 192 cases of COVID-19 patients*. *J Appl Lab Med*. 2021; 6(5): 1133-1142
85. Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z et al. *Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells*. *Cell Rep Med*. 2021; 2(7)
86. Zhang Y, Xu J, Jia R et al. *Protective humoral immunity in SARS-CoV-2 infected pediatric patients*. *Cell Mol Immunol*. 2020; 17(7):768-770
87. Chen J, Zhang Z, Chen Y et al. *The clinical and immunological features of pediatric COVID-19 patients in China*. *Genes & Diseases*, 2020; 7(4): 535-541
88. Figueiredo-Campos P, Blankenhaus B, Mota C et al. *Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset*. *Eur J Immunol*. 2020; 50(12):2025-2040

89. Zeng F, Dai C, Cai P et al. *A comparison study of SARS-CoV-2 IgG antibody between male and female COVID-19 patients: A possible reason underlying different outcome between sex.* J Med Virol. 2020; 92(10): 2050–2054
90. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P et al. *Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes.* Nature. 2020; 588(7837):315-320.
91. Wu L, Wang N, Chang Y et al. *Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome.* Emerg Infect Dis. 2007; 13(10): 1562–1564
92. Liu W, Fontanet A, Zhang P et al. *Two-year prospective study of the humoral immune response of patients with severe acute respiratory syndrome.* J Infect Dis. 2006; 193(6):792-5
93. Choe PG, Perrera RAPM, Park WB et al. *MERS-CoV Antibody Responses 1 Year after Symptom Onset, South Korea, 2015.* Emerg Infect Dis. 2017; 23(7):1079-1084
94. Alshukairi A, Khalid I, Ahmed WA et al. *Antibody Response and Disease Severity in Healthcare Worker MERS Survivors.* Emerg Infect Dis. 2016; 22(6):1113-1115
95. Crawford K., Dingens A., Eguia R. et al. *Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection.* J Inf Dis. 2021; 223:197–205
96. Wu J, Liang B, Chen C et al. *SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19.* Nat Commun. 2021; 12(1): 1813
97. Glück V, Grobecker S, Tydykov L et al. *SARS-CoV-2-directed antibodies persist for more than six months in a cohort with mild to moderate COVID-19.* Infection. 2021; 49: 739–746
98. Zheng Y, Zhang Q, Ali A. *Sustainability of SARS-CoV-2 Induced Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients from Hospitalization to Convalescence Over Six Months.* Virol Sin. 2021; 36(5): 869-878
99. Addetia A, Crawford K, Dingens A et al. *Neutralizing Antibodies Correlate with Protection from SARS-CoV-2 in Humans during a Fishery Vessel Outbreak with a High Attack Rate.* Journal of Clinical Microbiology, 2020; 58(11)
100. Lumley S, O'Donnell D, Stoesser N. et al. *Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers.* N Engl J Med. 2021; 384: 533-540
101. Wyllie D, Jones H, Mulchandani R et al. *SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworker.* Preprint, 2021
102. Okba NMA, Müller MA, Li W et al. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients.* Emerg Infect Dis. 2020; 26(7): 1478–1488

103. Cohen SA, Kellogg C, Equils O, *Neutralizing and cross-reacting antibodies: implications for immunotherapy and SARS-CoV-2 vaccine development*. Hum Vaccin Immunother. 2021; 17(1):84-87
104. Ju B, Zhang Q, Ge J et al. *Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection*. Nature. 2020; 584(7819):115-119
105. Lyer AS, Jones FK, Nodoushani A et al. *Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients*. Sci Immunol. 2020; 5(52)
106. Li Z, Yi Y, Luo X et al. *Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis*. J Med Virol. 2020; 92(9):1518-1524
107. Marinis YD, Sunnerhagen T, Bompada P et al. *Serology assessment of antibody response to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 by rapid IgM/IgG antibody test*. Infect Ecol Epidemiol. 2020; 10(1):1821513
108. Liu W, Liu L, Kou G et al. *Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2*. J Clin Microbiol. 2020; 58(6):e00461-20
109. Wolff F, Dahma H, Duterme C et al. *Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020; 98(3):115140
110. Beavis KG, Matushek SM, Abeleda AF et al. *Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies*. J Clin Virol. 2020; 129: 104468
111. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL et al. *Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis*. Diagnostics (Basel). 2020; 10(5):319
112. Gambino CM, Sasso BL, Colomba C et al. *Comparison of a rapid immunochromatographic test with a chemiluminescence immunoassay for detection of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG*. Biochem Med (Zagreb). 2020; 30(3):030901
113. Trabaud M, Icard V, Milon M et al. *Comparison of eight commercial, high-throughput, automated or ELISA*. J Clin Virol. 2020; 132:104613
114. Suhandynata RT, Hoffman MA, Kelner MJ et al. *Multi-Platform Comparison of SARS CoV-2 Serology Assays for the Detection of COVID-19 Humoral Immune Response to SARS-CoV-2*. J Appl Lab Med. 2020; 5(6):1324-1336
115. Padoan A, Bonfante F, Pagliari M et al. *Analytical and clinical performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity*. EBioMedicine. 2020; 62:103101
116. Kohmer N, Westhaus S, Rühl C et al. *Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests*. J Med Virol. 2020; 92(10):2243-2247
117. Dolgie E. *The tangled history of mRNA vaccines*, Nature, 2021; 597(7876):

318-324

118. Geall A, Verma A, Otten G et al. *Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109 (36): 14604-09
119. Brito L, Chan M, Shaw C et al. *A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines*. Mol Ther. 2014; 22(12): 2118-29
120. Soiza R, Scicluna C, Thomson E. *Efficacy and safety of COVID-19 vaccines in older people*. Age Ageing. 2021; 50(2): 279-283
121. Kim J, Eygeris Y, Grupta M, Sahay G. *Self-assembled mRNA vaccines*, Adv Drug Deliv Rev. 2021; 170: 83-112
122. Su S, Du L, Jiang S. *Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines*. Nat Rev Microbiol. 2021; 19: 211–219
123. Anderson E, Rouphael N, Widge A et al. *Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults*. N Engl J Med. 2020; 383: 2427-38
124. Jackson DA, Symons RH, Berg P. *Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1972; 69:2904–09
125. Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F et al. *Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies*, Nat Rev Immunol, 2020; 20(10): 615-632
126. Ura T, Okuda K, Shimada M. *Developments in Viral Vector-Based Vaccines, Vaccines (Basel)*. 2014; 2(3): 624–641
127. Saha B, Parks RJ. *Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells*. PloS One, 2017; 12(7)
128. Mendonca SA, Lorincz R, Boucher P. et al. *Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic*. Vaccines. 2021; 6(97)
129. Beatty MS, Curiel DT. *Chapter two-Adenovirus strategies for tissue-specific targeting*. Adv Cancer Res. 2012; 115: 39-67
130. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK et al. *Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial*. Lancet. 2020; 396(10249): 467-478
131. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA et al. *Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials*. Lancet. 2021; 397(10277): 881-891

132. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A et al. *Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19*. *New Engl J Med*. 2021; 384(23): 2187-2201
133. Stephenson KE, Gars ML, Sadoff J et al. *Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19*. *JAMA*. 2021; 325(15): 1535-1544
134. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On Y et al. *Waning immunity of the BNT162b2 vaccine: A nationwide study from Israel*. *N Engl J Med.*, 2021; 385(24): e85
135. Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N et al. *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months*. *New Engl J Med*. 2021; 385(19): 1761-73
136. Israel A, Shenhar Y, Green I et al. *Large-scale study of antibody titer decay following BNT162b2 mRNA vaccine or SARS-CoV-2 infection*. *Vaccines*. 2022; 10(1)
137. Widge A., Roupheal N., Jackson L. et al. *Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination*. *New Engl J Med*. 2021; 384(1): 80-82
138. Pegu A, O'Connell SE, Schmidt SD et al. *Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants*. *Science*, 2021; 373(6561): 1372-77
139. Nikolova M, Todorova Y, Emilova R et al. *Induction of humoral and cellular immune responses to COVID-19 mRNA and vector vaccines: A prospective cohort study in Bulgarian healthcare workers*. *J Med Virol*. 2022; 94(5): 2008-2018
140. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M et al. *Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19*. *New Engl J Med*. 2021; 384(23): 2259-61
141. Boyarsky BJ, Ruddy JA, Connolly CM et al. *Antibody response to a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine in patients with rheumatic and musculoskeletal diseases*. *Ann Rheum Dis*. 2021; 80(8):1098-1099
142. Braun-Moscovici Y, Kaplan M, Braun M et al. *Disease activity and humoral response in patients with inflammatory rheumatic diseases after two doses of the Pfizer mRNA vaccine against SARS-CoV-2*. *Ann Rheum Dis*. 2021; 80(10): 1317-21
143. Simon D, Tascilar K, Fagni F et al. *SARS-CoV-2 vaccination responses in untreated, conventionally treated and anticytokine-treated patients with immune-mediated inflammatory diseases*. *Ann Rheum Dis*. 2021; 80(10): 1312-16
144. Bertrand D, Hamzaoui M, Lemee V et al. *Antibody and T Cell Response to SARS-CoV-2 Messenger RNA BNT162b2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Hemodialysis Patients*. *J Am Soc Nephrol*. 2021; 32(9): 2147-52
145. Zitt E, Davidovic T, Sshimpf J et al. *The Safety and Immunogenicity of the*

*mRNA-BNT162b2 SARS-CoV-2 Vaccine in Hemodialysis Patients.* Front Immunol. 2021; 12: 704773

146. Longlune N, Nogier MB, Miedouge M et al. *High immunogenicity of a messenger RNA based vaccine against SARS-CoV-2 in chronic dialysis patients.* Nephrol Dial Transplant. 2021; 36(9): 1704-09

147. Hod T, Ben-David A, Olmer L et al. *Humoral Response of Renal Transplant Recipients to the BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Using Both RBD IgG and Neutralizing Antibodies.* Transplantation. 2021; 105(11): e234-e243

148. Cucchiari D, Egri N, Bodro M et al. *Cellular and humoral response after mRNA-1273 SARSCoV-2 vaccine in kidney transplant recipients.* Am J Transplant. 2021; 21(8): 2727-39

149. Rabinowich L, Grupper A, Baruch R et al. *Low immunogenicity to SARS-CoV-2 vaccination among liver transplant recipients.* J Hepatol. 2021; 75(2): 435-438

150. Goshen-Lago T, Waldhorn I, Holland R et al. *Serologic Status and Toxic Effects of the SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccine in Patients Undergoing Treatment for Cancer.* JAMA Oncol. 2021; 7(10): 1507-13

151. Lasagna A, Agustoni F, Percivalle E et al. *A snapshot of the immunogenicity, efficacy and safety of a full course of BNT162b2 anti-SARS-CoV-2 vaccine in cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors: a longitudinal cohort study.* ESMO Open. 2021; 6(5): 100272

152. Malard F, Gaugler B, Gozlan J et al. *Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies.* Blood cancer journal, 2021; 11(142)

153. Moutsopoulos HM. *A recommended paradigm for vaccination of rheumatic disease patients with the SARS-CoV-2 vaccine.* J Autoimmun. 2021; 121: 102649

154. Vaquero ST, Campos-Mata L, Ramada JM et al. *The mRNA-1273 Vaccine Induces Cross-Variant Antibody Responses to SARS-CoV-2 With Distinct Profiles in Individuals With or Without Pre-Existing Immunity.* Front Immunol. 2021; 12: 737083

155. Kayukawa S, Nanya K, Morita M et al. *Spike Antibody Titers Evaluation after a 2-Dose Regimen of BNT162b2 Vaccination in Healthcare Workers Previously Infected with SARS-CoV-2.* Microbiol Spectr. 2021; 9(3):e0103621

156. Trougakos IP, Terpos E, Zirou C et al. *Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients.* BMC med. 2021; 19(1): 208

157. Fraley E, LeMaster C, Geanes E et al. *Humoral immune responses during SARS-CoV-2 mRNA vaccine administration in seropositive and seronegative individuals.* BMC med. 2021; 19: 169

158. Levi R, Azzolini E, Pozzi C et al. *One dose of SARS-CoV-2 vaccine exponentially increases antibodies in individuals who have recovered from symptomatic COVID-19.* J Clin Invest. 2021; 131(12): e149154
159. Naranbhai V, Garcia-Beltran WF, Chang CC et al. *Comparative immunogenicity and effectiveness of mRNA-1273, BNT162b2 and Ad26.COV2.S COVID-19 vaccines.* J Infect Dis. 2022; 225(7): 1141-1150
160. Chen J, Wang R, Gilby NB et al. *Omicron (B.1.1.529): Infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance.* J Chem Inf Model. 2022; 62(2): 412-422
161. Gazit S, Shlezinger R, Perez G et al. *Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections.* Clin Infect Dis. 2022; 75(1): e545-e551
162. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F et al. *COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant.* N Engl J Med. 2022; 386:1532-1546
163. Wilhelm A, Widera M, Grikscheit K et al. *Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies.* EBioMedicine. 2022; 82:104158
164. Lou B, Li T, Zheng S et al. *Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset.* Eur Respir J. 2020: 2000763
165. Ma H, Zeng W, He H et al. *Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19.* Cell Mol Immunol. 2020; 17(7): 773–775
166. Mo H, Zeng G, Ren X et al. *Longitudinal profile of antibodies against SARS-coronavirus in SARS patients and their clinical significance.* Respirology. 2006; 11(1):49-53
167. Sariol A, Perlman S, *Lessons for Covid-19 immunity from other coronavirus infections.* Immunity. 2020; 53(2):248-263
168. Marot S, Malet I, Leducq V et al. *Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers.* Nat Commun. 2021; 12(1): 844
169. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P et al. *Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland.* N Engl J Med. 2020; 383(18):1724-1734
170. Liu C, Yu X, Gao C et al. *Characterization of antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients.* J Med Vir. 2020; 92(8)
171. Chirathaworn C, Sripramote M, Chalongviriyalert P et al. *SARS-CoV-2 RNA shedding in recovered COVID-19 cases and the presence of antibodies against SARS-CoV-2 in recovered COVID-19 cases and close contacts, Thailand, April-June 2020.* PLoS One. 2020; 15(10): e0236905

172. Peng P, Hu J, Deng H et al. *Changes in the humoral immunity response in SARS-CoV-2 convalescent patients over 8 months*. Cell Mol Immunol. 2021; 18(2):490-491
173. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi J et al. *Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2*. Nature. 2021; 591(7851):639-644
174. Petersen MS, Honsen CB, Kristiansen MF et al. *SARS-CoV-2 natural antibody response persists up to 12 months in a nationwide study from the Faroe Islands*. Open Forum Infect Dis. 2021; 8(8):ofab378
175. Li C, Yu D, Wu X et al. *Twelve-month specific IgG response to SARS-CoV-2 receptor-binding domain among COVID-19 convalescent plasma donors in Wuhan*. Nat Commun. 2021; 12(1):4846
176. Glück V, Grobecker S, Köhstler J et al. *Immunity after COVID-19 and vaccination: follow-up study over 1 year among medical personnel*. Infection. 2022; 50(2):439-446
177. Röltgen K, Powell AE, Wirz OF et al. *Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome*. Sci Immunol. 2020; 5(54):eabe0240
178. Rockstroh A, Wolf J, Fertey J et al. *Correlation of humoral immune responses to different SARS-CoV-2 antigens with virus neutralizing antibodies and symptomatic severity in a German COVID-19 cohort*. Emerg Microbes Infect. 2021; 10(1):774-781.
179. Wang X, Guo X, Xin Q et al. *Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients*. Clin Infect Dis. 2020; 71(10):2688-2694
180. Sterlin D, Mathian A, Miyara M et al. *IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2*. Sci Transl Med. 2021; 13(577):eabd2223
181. Long Q, Liu B, Deng H et al. *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19*. Nat Med. 2020; 26(6):845-848
182. Scheiblauer H, Nübling CM, Wolf T et al. *Antibody response to SARS-CoV-2 for more than one year – kinetics and persistence of detection are predominantly determined by avidity progression and test design*. J Clin Virol. 2022; 146:105052
183. Ivanov A, Semenova E, *Long-term monitoring of the development and extinction of IgA and IgG responses to SARS-CoV-2 infection*. J Med Virol. 2021; 93(10):5953-5960
184. Bruni M, Cecatiello V, Diaz-Basabe A et al. *Persistence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Non-Hospitalized COVID-19 Convalescent Health Care Workers*. J Clin Med. 2020; 9(10):3188
185. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A et al. *Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months*. Science. 2020; 370(6521):1227-1230

186. Wang K, Long Q, Deng H et al. *Longitudinal Dynamics of the Neutralizing Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection*. Clin Infect Dis. 2021; 73(3):e531-e539
187. Wu J, Liang B, Chen C et al. *SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19*. Nat Commun. 2021; 12(1):1813
188. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F et al. *Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals*. Nature. 2020; 584(7821):437-442
189. Crawford KHD, Dingens AS, Eguia R et al. *Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection*. J Infect Dis. 2021; 223(2):197-205
190. Speletas M, Voulgaridi I, Sarrou S et al. *Intensity and Dynamics of Anti-SARS-CoV-2 Immune Responses after BNT162b2 mRNA Vaccination: Implications for Public Health Vaccination Strategies*. Vaccines. 2022, 10(2): 316
191. Coppeta L, Somma G, Ferrari C et al. *Persistence of Anti-S Titre among Healthcare Workers Vaccinated with BNT162b2 mRNA COVID-19*. Vaccines (Basel). 2021; 9(9):947
192. Levin EG, Lustig Y, Cohen C et al. *Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months*. N Engl J Med. 2021; 385(24):e84
193. Coppeta L, Ferrari C, Somma G et al. *Reduced Titers of Circulating Anti-SARS-CoV-2 Antibodies and Risk of COVID-19 Infection in Healthcare Workers during the Nine Months after Immunization with the BNT162b2 mRNA Vaccine*. Vaccines (Basel). 2022; 10(2): 141.
194. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M et al. *Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19*. N Engl J Med. 2021; 384(23):2259-2261
195. Bayart J, Douxfils J, Gillot C et al. *Waning of IgG, Total and Neutralizing Antibodies 6 Months Post-Vaccination with BNT162b2 in Healthcare Workers*. Vaccines (Basel). 2021;9(10):1092
196. Ciabattini A, Pastore G, Fiorino F et al. *Evidence of SARS-CoV-2-Specific Memory B Cells Six Months After Vaccination With the BNT162b2 mRNA Vaccine*. Front Immunol. 2021; 12:740708
197. Wisnewski AV, Luna JC, Redlich CA, *Human IgG and IgA responses to COVID-19 mRNA vaccines*. PLoS One. 2021; 16(6):e0249499
198. Nikolova M, Todorova Y, Emilova R et al. *Induction of humoral and cellular immune responses to COVID-19 mRNA and vector vaccines: A prospective cohort study in Bulgarian healthcare workers*. J Med Virol. 2022; 94(5):2008-2018
199. Shrotri M, Navaratnam AMD, Nguyen V et al. *Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1*. Lancet. 2021; 398(10298):385-387

200. Wei J, Stoesser N, Matthews PC et al. *Antibody responses to SARS-CoV-2 vaccines in 45,965 adults from the general population of the United Kingdom*. *Nat Microbiol*. 2021; 6(9):1140-1149
201. Neumann F, Rose R, Römpke J et al. *Development of SARS-CoV-2 Specific IgG and Virus-Neutralizing Antibodies after Infection with Variants of Concern or Vaccination*. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(7): 700.
202. Wheeler SE, Shurin GV, Yost M et al. *Differential Antibody Response to mRNA COVID-19 Vaccines in Healthy Subjects*. *Microbiol Spectr*. 2021; 9(1):e0034121
203. Menni C, May A, Polidori L et al. *COVID-19 vaccine waning and effectiveness and side-effects of boosters: a prospective community study from the ZOE COVID Study*. *Lancet*. 2022; 22(7): 1002-1010
204. Wu AHB, Nguyen ED, Ong CM et al. *Rate of Serum SARS-CoV-2 Antibody Decline for two mRNA Vaccines*. *J Appl Lab Med*. 2022; 7(2):625-627
205. Lustig Y, Sapir E, Regev-Yochay G et al. *BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal cohort study in health-care workers*. *Lancet*. 2021; 9(9): 999-1009
206. Cho A, Muecksch F, Schaefer – Babajew D et al. *Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain antibody evolution after mRNA vaccination*. *Nature*. 2021; 600:517-522
207. Šošić L, Paolucci M, Duda A et al. *Kinetics and persistence of anti-SARS-CoV-2 neutralisation and antibodies after BNT162b2 vaccination in a Swiss cohort*. *Immun Inflamm Dis*. 2022; 10(3):e583
208. Ponticelli D, Antonazzo IC, Caci G et al. *Dynamics of antibody response to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine after 6 months*. *J Travel Med*. 2021; 28(8):taab173
209. Mihaylova A, Lesichkova S, Baleva M et al. *Durability of humoral and cell-mediated immune response after SARS-CoV-2 mRNA vaccine administration*. *J Med Virol*. 2023; 95(1)
210. Steensels D, Pierlet N, Penders J et al. *Comparison of SARS-CoV-2 Antibody Response Following Vaccination With BNT162b2 and mRNA-1273*. *JAMA*. 2021; 326(15):1533-1535
211. Perez-Alos L, Armenteros JJA, Madsen JR et al. *Modeling of waning immunity after SARS-CoV-2 vaccination and influencing factors*. *Nat Commun*. 2022; 13
212. Terpos E, Trougakos IP, Apostolakou F et al. *Age-dependent and gender-dependent antibody responses against SARS-CoV-2 in health workers and octogenarians after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine*. *Am J Hematol*. 2021; 96(7): E257–E259.

213. Terpos E, Karalis V, Ntanasis-Stathopoulos I et al. *Robust Neutralizing Antibody Responses 6 Months Post Vaccination with BNT162b2: A Prospective Study in 308 Healthy Individuals*. Life (Basel). 2021; 11(10): 1077
214. Pellini R, Venuti A, Pimpinelli F et al. *Initial observations on age, gender, BMI and hypertension in antibody responses to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine*. EClinicalMedicine. 2021; 36:100928
215. Müller L, Andree M, Moskorz W et al. *Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination*. Clin Infect Dis. 2021; 73(11):2065-2072
216. Costa C, Migliore E, Galassi C et al. *Factors Influencing Level and Persistence of Anti SARS-CoV-2 IgG after BNT162b2 Vaccine: Evidence from a Large Cohort of Healthcare Workers*. Vaccines (Basel). 2022; 10(3):474
217. Röltgen K, Nielsen SCA, Arunachalam PS et al. *mRNA vaccination compared to infection elicits an IgG-predominant response with greater SARS-CoV-2 specificity and similar decrease in variant spike recognition*. Preprint, 2021
218. Busa R, Sorrentino MC, Russelli G et al. *Specific Anti-SARS-CoV-2 Humoral and Cellular Immune Responses After Booster Dose of BNT162b2 Pfizer-BioNTech mRNA-Based Vaccine: Integrated Study of Adaptive Immune System Components*. Front Immunol. 2022; 13:856657.
219. Debes AK, Xiao S, Egbert ER et al. *Comparison of total and neutralizing SARS-CoV-2 spike antibodies against omicron and other variants in paired samples after two or three doses of mRNA vaccine*. Microbiology spectrum. 2022; 10(5)
220. Tan CS, Collier AY, Liu J et al. *Durability of Heterologous and Homologous COVID-19 Vaccine Boosts*. JAMA Netw Open. 2022; 5(8)
221. Sablerolles RSG, Rietdijk WJR, Goorhuis A et al. *Immunogenicity and Reactogenicity of Vaccine Boosters after Ad26.COV2.S Priming*. N Engl J Med. 2022; 386(10):951-963
222. Liu X, Shaw RH, Stuart ASV et al. *Safety and immunogenicity of heterologous versus homologous prime-boost schedules with an adenoviral vectored and mRNA COVID-19 vaccine (Com-COV): a single-blind, randomised, non-inferiority trial*. Lancet. 2021; 398(10303): 856-869
223. Garcia-Beltran WF, Denis KJS, Hoelzemer A et al. *mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant*. Cell. 2022; 185(3):457-466
224. Nemet I, Klikler L, Yustig Y et al. *Third BNT162b2 Vaccination Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Infection*. N Engl J Med. 2022; 386(5):492-494
225. Wu M, Wall EC, Carr EJ et al. *Three-dose vaccination elicits neutralising antibodies against omicron*. Lancet. 2022; 399(10326): 715-717
226. Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M et al. *Protection of BNT162b2 Vaccine Booster against Covid-19 in Israel*. N Engl J Med. 2021; 385(26):2421-2430

227. <https://www.who.int/news/item/01-06-2022-interim-statement-on-hybrid-immunity-and-increasing-population-seroprevalence-rates>
228. Ontañón J, Blas J, De Cabo C et al. *Influence of past infection with SARS-CoV-2 on the response to the BNT162b2 mRNA vaccine in health care workers: Kinetics and durability of the humoral immune response-NC-ND license.* EBioMedicine. 2021; 73:103656
229. Levi R, Azzolini E, Pozzi C et al. *One dose of SARS-CoV-2 vaccine exponentially increases antibodies in individuals who have recovered from symptomatic COVID-19.* J Clin Invest. 2021; 131(12):e149154.
230. Trougakos IP, Terpos E, Zirou C et al. *Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients.* BMC Med. 2021 Aug 23;19(1):208
231. Glück V, Tydykov L, Mader A et al. *Humoral immunity in dually vaccinated SARS-CoV-2-naïve individuals and in booster-vaccinated COVID-19-convalescent subjects.* Infection. 2022
232. Batra G, Murugesan DR, Chattopadhyay S et al. *Trends of humoral immune responses to heterologous antigenic exposure due to vaccination & omicron SARS-CoV-2 infection: Implications for boosting.* Indian J Med Res. 2023; 157(6):509-518
233. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA et al. *mRNA Vaccination Induces Durable Immune Memory to SARS-CoV-2 with Continued Evolution to Variants of Concern.* Science. 2021; 374(6572):abm0829.
234. Tut G, Lancaster T, Krutikov M et al. *Profile of humoral and cellular immune responses to single doses of BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 vaccines in residents and staff within residential care homes (VIVALDI): an observational study.* Lancet Healthy Longev. 2021 Sep;2(9):e544-e553
235. Gobbi F, Buonfrate D, Moro L et al. *Antibody Response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Subjects with Prior SARS-CoV-2 Infection.* Viruses. 2021;13(3):422
236. Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Ayoub HH et al. *Association of Prior SARS-CoV-2 Infection With Risk of Breakthrough Infection Following mRNA Vaccination in Qatar.* JAMA. 2021; 326(19):1930-1939
237. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM et al. *Protection and Waning of Natural and Hybrid Immunity to SARS-CoV-2.* N Engl J Med 2022; 386: 2201-2212
238. Yang SL, Ripen AM, Leong CT et al. *COVID-19 breakthrough infections and humoral immune response among BNT162b2 vaccinated healthcare workers in Malaysia.* Emerg Microbes Infect. 2022; 11(1):1262-1271
239. Walls AC, Sprouse KR, Bowen JE et al. *SARS-CoV-2 breakthrough infections elicit potent, broad, and durable neutralizing antibody responses.* Cell. 2022; 185(5):872-880

240. Collier AY, Brown CM, McMahan K et al. *Characterization of immune responses in fully vaccinated individuals after breakthrough infection with the SARS-CoV-2 delta variant.* *Sci Transl Med.* 2022; 14(641)
241. Kitchin D, Richardson SI, Mescht MA et al. *Ad26.COV2.S breakthrough infections induce high titers of neutralizing antibodies against Omicron and other SARS-CoV-2 variants of concern.* *Cell.* 2022; 3(3): 100535
242. Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y et al. *Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants.* *Cell.* 2022; 3(4): 249-261
243. Servellita V, Syed AM, Morris MK et al. *Neutralizing immunity in vaccine breakthrough infections from the SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants.* *Cell.* 2022; 185(9):1539-1548
244. Favresse J, Dogne J, Douxfils J, *Assessment of the humoral response in Omicron breakthrough cases in healthcare workers who received the BNT162b2 booster.* *Clin Chem Lab Med.* 2022; 60(7):e153-e156
245. Dimeglio C, Miguères M, Mansuy J et al. *Antibody titers and breakthrough infections with Omicron Sars-Cov-2.* *J Infect.* 2022; 84(4): e13–e15
246. Bates TA, McBride SK, Leier HC et al. *Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants.* *Sci Immunol.* 2022; 7(68):eabn8014
247. Mantus G, Nyhoff LE, Edara V et al. *Pre-existing SARS-CoV-2 immunity influences potency, breadth, and durability of the humoral response to SARS-CoV-2 vaccination.* *Cell Rep Med.* 2022; 3(4):100603
248. Forgacs D, Moraes VS, Hanley HB et al. *The Effect of Waning on Antibody Levels and Memory B Cell Recall following SARS-CoV-2 Infection or Vaccination.* *Vaccines (Basel).* 2022;10(5):696
249. Struck F, Schreiner P, Staschick E et al. *Vaccination versus infection with SARS-CoV-2: Establishment of a high avidity IgG response versus incomplete avidity maturation.* *J Med Virol.* 2021; 93(12):6765-6777
250. Wratil PR, Stern M, Priller A et al. *Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern.* *Nat Med.* 2022; 28: 496-503

