

Serološka analiza cijepljenih i preboljelih u COVID-19 epidemiji

Badovinac, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:203694>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Sara Badovinac

SEROLOŠKA ANALIZA CIJEPLJENIH I PREBOLJELIH U COVID-19 EPIDEMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Sara Badovinac

SEROLOŠKA ANALIZA CIJEPLJENIH I PREBOLJELIH U COVID-19 EPIDEMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

Mentor rada: prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača, dr.med.

Komentor rada: doc. dr. sc. Željko Linšak, dipl. sanit. ing.

Diplomski rad ocjenjen je dana 24.06.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Pero Lučin, dr. med.

2. Izv. prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac, dr. med.

3. Doc. dr. sc. Lovorka Bilajac, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 47 stranica, 20 slika, 0 tablica, 39 literaturnih navoda.

Posveta i zahvala:

U prvom redu se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Zlatku Trobonjači na pruženoj pomoći, smjernicama i strpljenju prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala dugujem i djelatnicima Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo PGŽ, ne samo zbog omogućenog pristupa podacima i pomoći u pronalasku istih, već što su učinili da se osjećam prihvaćeno i slobodno realizirati svoju ideju. Hvala mom komentoru, doc. dr. sc. Željku Linšaku, prof. dr. sc. Vladimiru Mićoviću, dr. sc. Dolores Peruč, Barbari Kvartuč, Maji Ružić i Dini Butković.

I na kraju, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji. Hvala vam na neizmjerne podršci, bezuvjetnoj ljubavi i motivaciji koje ste mi pružali tijekom studija. Nadam se da sam vas učinila ponosnima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SARS-CoV-2 virus i ulazak u stanicu domaćina	1
2.1. COVID-19 bolest	2
2.1.1. Imunopatofiziologija akutne teške COVID-19 bolesti.....	2
2.1.2. Imunopatofiziologija post-akutnog COVID-19 sindroma.....	4
3.1. Imunosni odgovor na SARS-CoV-2 virus	6
3.1.1. Urođeni imunosni odgovor.....	6
3.1.2. Adaptivni imunosni odgovor.....	7
4.1. Cijepljenje protiv COVID-19 bolesti	8
2. SVRHA RADA	10
3. ISPITANICI I POSTUPCI	11
4. REZULTATI	20
5. RASPRAVA	28
6. ZAKLJUČAK	35
7. SAŽETAK	37
8. SUMMARY	38
9. LITERATURA	39
10. ŽIVOTOPIS	46

POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

COVID-19 - coronavirus disease 2019

SARS-CoV-2 - severe acute respiratory syndrome coronavirus-2

RNA – ribonucleic acid

ACE2 – angiotenzin konvertirajući enzim 2

DM – diabetes mellitus

VOC – variant of concern

PRR – pattern recognition receptor

PAMP – pathogen associated molecular patterns

DAMP – damage-associated molecular patterns

IL-6 – interleukin-6

IL-8 – interleukin-8

TNF- α – tumor necrosis factor- α

IFN- γ – interferon- γ

IL-17 – interleukin-17

TGF- β – tumor growth factor- β

eGFR – estimated glomerular filtration rate

TLR-7 – toll like receptor-7

TLR-8 – toll like receptor-8

RLR - RIG-I-like receptors

NFκB – Nuclear factor-κB

IFITM - interferon-induced transmembrane protein

IFI16 - Interferon Gamma Inducible Protein 16

MHC – major histocompatibility complex

RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction

NZZJZ PGŽ – Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije

DNA – deoxyribonucleic acid

cDNA - complementary DNA

CT – cycle threshold

CMIA - chemiluminescent microparticle immunoassay

ELFA - Enzyme-linked fluorescent assay

RLU – relative light units

1. UVOD

U prosincu 2019. godine u kineskom gradu Wuhanu pojavio se novi koronavirus, nazvan SARS-CoV-2. Bolest koju virus uzrokuje nazvana je COVID-19. U prva dva mjeseca od pojave virusa primjećeno je širenje virusa izvan Kine na gotovo sve države svijeta. S ciljem prevencije daljnje transmisije virusa, SZO je proglasila Međunarodna hitna situacija proglašena je 30. siječnja 2020., u svrhu prevencije daljnje transmisije virusa. 11. ožujka 2020. Svjetska zdravstvena organizacija proglasila je globalnu pandemiju. Prvi slučaj u Hrvatskoj dijagnosticiran je 25. veljače 2020.

1.1. SARS-CoV-2 virus i ulazak u stanicu domaćina

SARS-CoV-2 virus građen je od nukleokapside i virusne ovojnice. Nukleokapsidu čini genetski materijal virusa, jednolančana pozitivno-smisljena RNA i protein nukleokapside (N). Nukleokapsida je obavijena ovojnicom koja sadrži tri strukturalna proteina virusa: membranski protein (M, od engl membrane), šiljasti protein (S, od engl spike) i protein ovojnice (E, od engl envelope). (1) Receptor kojeg virus koristi za ulazak u stanicu domaćina je enzim ACE2, a receptorska domena virusa smještena je na šiljastom proteinu (S), koji posreduje pričvršćivanje za membranu stanice i fuziju virusne čestice i stanice domaćina. Osim ACE2, nekoliko je molekula predloženo da služe kao alternativni receptori za SARS-CoV-2. To uključuje lektine, koji su uključeni u prepoznavanje širokog spektra patogena i posreduju međustaničnu adheziju prepoznavanjem glikana na površini virusne čestice. (2) CD147, transmembranski glikoprotein eksprimiran u epitelnim i stanicama imunskog sustava, također je predložen kao alternativni receptor za SARS-CoV-2 virus. Povećana ekspresija CD147 primjećena je u pretilih i pacijenata koji boluju od DM tipa 2 i korelira s težom kliničkom slikom COVID-19 bolesti. (2) Uočeno je povećanje internalizacije virusa u stanice koje eksprimiraju više CD147, iako je za ulaz virusa u stanicu nužna prisutnost ACE2. (2) Kao i drugi RNA virusi, SARS-CoV-2 je sklon genetskoj

evoluciji razvojem mutacija tijekom vremena, što rezultira različitim varijantama virusa. Najvarijabilnija regija je receptor vezujuća domena u šiljastom proteinu virusa. (3) Tijekom pandemije opisano je nekoliko varijanti SARS-CoV-2. Neke od njih klasificirane su od strane SZO-a kao zabrinjavajuće varijante (VOC), bilo zbog ubrzanog širenja, povećanja virulencije, sposobnosti izazivanja teže kliničke slike ili smanjenja učinkovitosti javnozdravstvenih mjera i dostupnih dijagnostičkih metoda, cjepiva i lijekova. (4) Alpha (B.1.1.7) je varijanta zabrinutosti koja se prvi put pojavila u Ujedinjenom Kraljevstvu krajem rujna 2020. Beta (B.1.351) se prvi put pojavila u Južnoj Africi u svibnju 2020., Delta (B.1.617.2) u listopadu 2020. u Indiji, a Gamma (P.1) varijanta u Brazilu u studenom 2020. Posljednja značajna varijanta zabrinutosti, Omicron (B.1.1.529), pojavila se u Južnoj Africi u studenom 2021. godine. (5)

2.1. COVID-19 bolest

COVID-19 je danas prepoznat kao višeorganska bolest sa širokim spektrom kako akutnih, tako i post-akutnih manifestacija. Post-akutni COVID-19 definiran je kao sindrom karakteriziran trajnim simptomima i/ili odgođenim ili dugotrajnim komplikacijama koje perzistiraju 4 tjedna od početka simptoma. (6) COVID-19 se manifestira simptomima u rasponu od potpuno asimptomatskih do teških slučajeva koji rezultiraju značajnim morbiditetom i mortalitetom. Najčešći simptomi su vrućica, kašalj i nedostatak daha, a dodatni simptomi uključuju umor, mijalgije, povraćanje, proljev, glavobolju, slabost, rinoreju, anosmiju i ageuziju. Široki niz komplikacija može dovesti do teške bolesti i smrti, uključujući upalu pluća, sindrom akutnog respiratornog distresa, ozljedu jetre, srčanu bolest, trombozu, moždani udar, bubrežnu bolest, neurološku bolest i sepsu. (7)

2.1.1. Imunopatofiziologija akutne teške COVID-19 bolesti

Oštećenja u sklopu najčešće manifestacije COVID-19 bolesti, pneumonije, odvijaju se u dvije faze. Prva faza je širenje virusa koju karakterizira replikacija virusa i izravno, virusima posredovano,

oštećenje tkiva. Opseg ovoga oštećenja određuje patogenezu sekundarne faze, u kojoj dolazi do aktivacije efektorskih imunskih stanica što rezultira lokalnim i sistemskim upalnim odgovorom.

(8) Teži oblik COVID-19 bolesti karakterizira upalni odgovor koji uključuje pretjeranu aktivaciju imunskih stanica i posljedično tome masivnu produkciju upalnih medijatora, citokina, koji se mogu detektirati u plućima i u krvotoku. (8) Poticaj za lučenje citokina dobiva se vezanjem PAMP ili DAMP liganda na PRR receptor, kojeg u najvećoj mjeri ekspimiraju antigen-prezentirajuće stanice imunskog sustava. PAMP su domaćinu strane virusne molekule, a DAMP molekule su sastavni dio urođenog imunskog odgovora čija se ekspresija potiče u oštećenim ili umirućim stanicama uslijed ozljede ili infekcije patogenom. (9) Osim poželjnog antivirusnog učinka, citokini uzrokuju mnoge nepoželjne učinke: podržavanjem upalnog odgovora doprinose patološkim procesima povezanim s samom infekcijom, kao što su smrt epitelnih i endotelnih stanica i posljedična tromboza. (8) Citokinska oluja u sklopu virusne infekcije uočena je u kritično bolesnih pacijenata. Širenje SARS-CoV-2 dovodi do lučenja niza proupalnih citokina kao što su IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ i IL-17. (8) Del Valle i sur. dokazali su da su visoke razine IL-6, i TNF- α u serumu u vrijeme hospitalizacije značajni prediktori težine bolesti i smrti. (10) Potencijalni uzroci pretjeranog upalnog odgovora uključuju nagomilavanje nezrelih monocita, neutrofila i mijeloidnih prekursorskih stanica u cirkulaciji te njihovu aktivaciju što uzrokuje proizvodnju velikih količina proupalnih citokina. S druge strane, broj plućnih makrofaga koji imaju ulogu u održavanju homeostaze i reparaciji plućnog parenhima često je smanjen u teških bolesnika, kao i zastupljenost NK stanica i limfocita T u perifernoj krvi. (7) Uzrok smanjenom broju stanica može biti izravno virusno oštećenje ili stanična smrt posredovana imunskim mehanizmima. (7) U teškim oblicima COVID-19 bolesti pronađena su i protutijela na vlastite antigene: antinuklearna protutijela, protutijela na fosfolipide, kemokine, citokine i antigene T i B limfocita, koja doprinose održavanju upalne reakcije. (7) Razine interferona tipa 1 i tipa 3, koji su važni u urođenom imunskom

odgovoru, značajno su snižene u pacijenata s teškim oblikom bolesti, kao i u pacijenata s genetskim mutacijama ili autoantitijelima koja ometaju funkciju interferenskog sustava. (11)

2.1.2. Imunopatofiziologija post-akutnog COVID-19 sindroma

Dugotrajne komplikacije ili produljeni simptomi COVID-19 bolesti mogu se očitovati u svim organskim sustavima, mjesecima nakon negativnog nalaza RT-PCR testa. Moguća objašnjenja imunopatofiziologije post-akutnog COVID-19 sindroma uključuju perzistiranje virusa ili virusnih antigena u tkivima i posljedičnu kroničnu upalu, autoimunost koja se pojavljuje kao posljedica akutne virusne infekcije, disbiozu mikrobioma ili viroma, te izostanak pravilne regeneracije tkiva nakon akutne bolesti. (7) Sekvele u respiratornom sustavu u prvom se redu manifestiraju kao kronična dispneja. (6) U podlozi stoji imunosno posredovano oštećenje endotelno-epitelne barijere, koje omogućuje ekstravazaciju eksudata i migraciju povećanog broja neutrofila i monocita u alveolarni prostor. IL-6 i TGF- β koji se pri tome izlučuju dovode do proliferacije miofibroblasta i razvoja plućne fibroze. (6) Koagulopatija povezana s COVID-19 komplikacija je koja se očituje venskom tromboembolijom u <5% slučajeva. (6) Mehanizmi aktivacije trombocita u prekomjernoj upali uključuju ozljedu endotela, aktivaciju komplementa i trombocita, interakcije trombocita i leukocita, oslobađanje proupalnih citokina, poremećaj normalnih puteva koagulacije i hipoksiju. Smatra se da je rizik tromboze u post-akutnoj fazi COVID-19 bolesti povezan s trajanjem i težinom hiperinflamatornog stanja. (6) Kardiovaskularne sekvele uključuju bol u prsima i palpitacije. Do oštećenja dolazi na nekoliko načina: izravnom virusnom invazijom miocita, smanjenjem broja ACE2 receptora što uzrokuje disregulaciju renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava te upalom koja oštećuje strukturni integritet miokarda, perikarda i provodnog sustava srca. (6) Osim što dovodi do smrti kardiomiocita, prolongirani upalni odgovor rezultira fibrozom miokarda i gubitkom dezmosomalnih proteina važnih za međusobno prijanjanje stanica. Fibroza miokarda i

kardiomiopatija koja nastaje kao posljedica virusne infekcije mogu dovesti do pojave *re-entry* aritmija. (6) Moguće je i pogoršanje postojećih aritmija produljenjem ventrikularnih akcijskih potencijala do čega dolazi modulacijom genske ekspresije ionskih kanala kardiomiocita, pod utjecajem IL-6, IL-1 i TNF- α . (12) Neuropsihijatrijske sekvele uključuju umor, mijalgiju, glavobolju, anksioznost, depresiju, poremećaje spavanja i kognitivno oštećenje. Iako zasad nema uvjerljivih dokaza da SARS-CoV-2 inficira neurone, pronađene promjene u parenhimu mozga tumače se štetnim učinkom virusa na stanice krvno-moždane barijere. (6) Oštećenje barijere potiče upalni proces u neuronima, potpornim stanicama mozga i endotelu krvnih žila mozga, čija je izraženost u direktnoj pozitivnoj korelaciji s stupnjem kognitivne disfunkcije. (13) Ostali predloženi mehanizmi nastanka neuralnog oštećenja još se moraju dokazati, a uključuju poremećaj limfne drenaže iz cirkumventrikularnih organa mozga i invaziju virusa u ekstracelularne prostore olfaktornog epitela te pasivnu difuziju i aksonalni transport. (6) Oštećenje bubrega u sklopu COVID-19 sindroma akutno se prezentira kao akutna tubularna nekroza, a kronično kao kronično bubrežno zatajenje u čijoj je podlozi fokalna segmentna glomeruloskleroza. Također, mikrotromboze u bubrežnoj cirkulaciji potencijalno doprinose razvoju bubrežnog oštećenja. (6) ACE2 je u velikom broju izražen u epitelnim stanicama proksimalnog bubrežnog tubula, što olakšava ulazak virusa u stanice i izravni citotoksični učinak uz imunosni posredovano oštećenje. (14) Smatra se da fokalna segmentna glomeruloskleroza nastaje kao odgovor tkiva na djelovanje interferona i kemokina koji se luče u sklopu upalne reakcije. (6) Iako do razvoja kroničnog bubrežnog zatajenja najčešće dolazi progresivno, nastavno na ekstenzivnu akutnu bubrežnu ozljedu, Huang i sur. dokazali su da je 13% pacijenata bez akutne ozljede bubrega i s normalnim eGFR u akutnoj fazi imalo smanjen eGFR u praćenju. (14)

3.1. Imunosni odgovor na SARS-CoV-2 virus

Urođeni ili nespecifični imunosni odgovor aktivira se na prisutnost svakog organizmu stranog antigena, a uključuje: anatomske i kemijske barijere organizma, fagocite, proteine sustava komplementa, antibakterijske proteine i citokine. (15) S druge strane, stečeni ili adaptivni imunosni odgovor dijeli se na humoralni kojeg čine protutijela i celularni kojeg čine T i B limfociti. Adaptivni imunosni odgovor karakterizira specifičnost i sposobnost imunosnog pamćenja, što ga čini ključnim za dugoročnu zaštitu od SARS-CoV-2 virusa. (16) Urođeni imunosni odgovor ograničava replikaciju virusa unutar inficiranih stanica i preduvjet je za aktivaciju adaptivnog imunosnog odgovora. (17)

3.1.1. Urođeni imunosni odgovor

Glavni receptori stanica urođenog imunosnog sustava koji vežu strane antigene su PRR receptori. RNA virusi kao što su koronavirusi detektiraju se na dva načina. Prvi uključuje dendritičke stanice koje otkrivaju virusnu RNA u endosomu putem TLR-7, receptora koji pripada skupini PRR. Monociti i makrofazi eksprimiraju TLR-8, što im također omogućuje prepoznavanje endocitirane jednolančane RNA SARS-CoV-2 virusa. (7). Drugi način uključuje prepoznavanje virusa unutar zaraženih stanica. Tijekom replikacije virusa citosolni RLR receptori, također receptori iz skupine PRR, prepoznaju molekule dvolančane RNA. Aktivacija TLR i RLR receptora pokreće signalni put kojim se aktivira transkripcija gena za proupalne citokine i kemokine: interferone tipa 1 i 3 i NF-kB. (7). Signalni put pokrenut vezanjem interferona tipa 1 i tipa 3 za njihove receptore rezultira ekspresijom interferon-stimulirajućih gena, koji kodiraju proteine s različitim antivirusnim učincima. Primjerice, IFITM proteini inhibiraju ulazak virusa u stanicu blokirajući fuziju ovojnice virusa i stanične membrane, a IFI16 protein inhibira sintezu virusne mRNA. (18) Pravovremena ekspresija i funkcija proteina induciranih IFN-om osnova su ranog imunosnog odgovora. U

pacijenata s teškom kliničkom slikom nalazi se prethodno opisano prekomjerno lučenje proupalnih citokina i disregulacija kasnog upalnog odgovora, ali i oslabljen rani antivirusni odgovor posredovan interferonima tipa 1 i 3. (7)

3.1.2. Adaptivni imunosni odgovor

Proučavanje adaptivnog imunosnog odgovora, humoralne i celularne imunosti, omogućava definiranje dugotrajnog imuniteta prema SARS-CoV-2 virusu, razvoj imunosne terapije i usavršavanje postojećih cjepiva i načina njihove primjene. (7) Adaptivni imunosni odgovor uključuje selekciju, proliferaciju i diferencijaciju nezrelih T i B limfocita u specifične efektorske stanice. Ovaj proces se završava 6-10 dana nakon aktivacije stanica urođenog imunosnog odgovora, što adaptivni odgovor čini značajno sporijim. (17) U 90% inficiranih pacijenata serokonverzija nastupa unutar deset dana od kontakta s SARS-CoV-2 virusom, a količina stvorenih protutijela proporcionalna je stupnju antigenskog opterećenja. (17) Protutijela stvorena u odgovoru na infekciju imaju sposobnost neutralizacije virusa blokirajući vezanje proteina šiljka i ACE2 receptora na dva načina. Najveći dio neutralizirajućih protutijela komplementarno je receptor-vezujućoj domeni proteina šiljka, dok manji dio protutijela dijeli sličan aminokiselinski slijed s ACE2 receptorom i mehanizmom molekularne mimikrije indirektno inhibira vezanje virusa za stanicu domaćina. (7) IgG, IgA i IgM protutijela na protein šiljka razvijaju se istovremeno. (17) Izuzev neutralizirajućeg učinka, Fc ovisna efektorska aktivnost protutijela također doprinosi obrani organizma od infekcije. (17) Smrtni ishod COVID-19 sindroma povezan je s oslabljenom funkcijom IgG protutijela, poremećajima vezivanja Fc receptora i poremećajima Fc efektorske aktivnosti. (19) Razni virusni antigeni, uključujući strukturne i nestrukturne proteine virusa daju poticaj za stvaranje CD4⁺ i CD8⁺ limfocita T. Ipak, poseban interes usmjeren je na CD4⁺ T limfocit specifične za šiljasti protein SARS-CoV-2 virusa, jer se mehanizam djelovanja gotovo

svih trenutno dostupnih cjepiva temelju upravo na tom proteinu. (17) CD4⁺ T stanice imaju sposobnost diferenciranja u niz pomoćničkih i efektorskih stanica koje su nužne za aktivaciju limfocita B, funkciju citotoksičnih CD8⁺ limfocita T, danje regrutiranje stanica urođenog imunskog odgovora, a uz to imaju izravne antivirusne učinke i doprinose reparaciji tkiva. (17) Primjerice, jedna od podvrsta CD4⁺ T limfocita, folikularni pomoćnički limfociti (T_{fh}), posreduju aktivaciju B limfocita i time stvaranje neutralizirajućih protutijela, memorijskih B limfocita i dugotrajnog humoralnog imuniteta. (17) Th1 stanice usmjeravaju imunski odgovor lučenjem IFN- γ , koji je ujedno glavni citokin SARS-CoV-2 -specifičnih CD4⁺ T limfocita. (17) CD8⁺ T stanice imaju sposobnost izravnog ubijanja inficiranih stanica i u sklopu akutne infekcije izlučuju veliku količinu molekula potentne citotoksične aktivnosti kao što su granzim B, perforin i IFN- γ . (17) Konačno, memorijski T limfociti imaju ključnu ulogu u dugoročnoj imunosti prema SARS-CoV-2 virusu. (17) Štoviše, dokazana je sposobnost kontrole SARS-CoV-2 infekcije bez detektabilnih razina neutralizirajućih protutijela, samo na temelju jakog odgovora T memorijskih stanica. (20) Dan i sur. su na uzorku od 188 pacijenata dokazali titar protutijela u serumu kao slabo prediktivan za razinu SARS-CoV-2 specifičnih CD4⁺ limfocita. (21) Unatoč tome, neutralizirajuća protutijela se uz memorijske B i T limfocite smatraju stavkom imunosne memorije, a praktičnost njihovog mjerenja za razliku od složenijeg mjerenja specifičnih T limfocita čini ih važnim pokazateljem imunosti u brojnim istraživanjima. (17)

4.1. Cijepljenje protiv COVID-19 bolesti

Trenutno dostupna cjepiva protiv COVID-19 bolesti se temelje na inhibiciji mehanizma ulaska virusa u stanice, koja se postiže poticanjem stvaranja protutijela i T limfocita koji su specifični za protein šiljka. (2) Cjepiva temeljena na mRNA tehnologiji su Comirnaty cjepivo proizvođača Pfizer/Biontech i Spikevax cjepivo, ranijeg naziva COVID-19 Moderna. Ova cjepiva potiču

imunost koristeći molekulu glasničke ribonukleinske kiseline koju prepoznaju receptori na površini brojnih stanica, kao i endosomalni i citosolni receptori unutar stanica. Dodatno, mRNA obložena je lipidnim nanočesticama što ju čini lipofilnom i tako joj omogućava ulazak u stanice. Egzogeni mRNA administrirana cjepivom daje stanicama gensku uputu za stvaranje proteina šiljka, odnosno potiče endogenu sintezu antigena koji će pokrenuti imunski odgovor. (22) Osim što potiču snažni odgovor CD4+ T stanica, mRNA cjepiva za razliku od proteinskih cjepiva potiču i snažni odgovor CD8+ T limfocita. Pretpostavlja se da je uzrok tome prezentacija endogeno stvorenog antigena u sklopu molekula MHC sustava klase I kojeg prepoznaju CD8+ stanice, za razliku od egzogenih antigena koji se prezentiraju u sklopu molekula MHC sustava klase II kojeg prepoznaju CD4+ stanice. (22) mRNA cjepiva se smatraju sigurnim cjepivima budući da proces njihove proizvodnje ne zahtjeva primjenu toksičnih kemikalija niti staničnih kultura koje mogu potencijalno biti kontaminirane virusima, a uz to relativno kratko trajanje samog proizvodnog procesa doprinosi smanjenju mogućnosti kontaminacije. (22) S druge strane, dostupna vektorska cjepiva su cjepivo Vaxzevria i cjepivo Jcovden, poznatija pod nazivima AstraZeneca i Janssen. Vektorska cjepiva sadrže genetski modificirane adenoviruse izmjenjene na način da posjeduju gensku uputu za proizvodnju proteina šiljka u obliku DNA, ali ne i sposobnost replikacije odnosno izazivanja bolesti. (23) Genetski modificirani adenovirusi rastu u specijaliziranoj kulturi stanica i pročišćavaju se prije stvaranja samog adenovirusnog cjepiva, što produljuje proizvodni proces vektorskih cjepiva u odnosu na proizvodni proces cjepiva utemeljenih na mRNA tehnologiji. (22, 23) Definiranje trajanja imunosti memorije stvorene primjenom cjepiva i razlozi moguće neučinkovitosti cjepiva prema novim varijantama virusa centar su interesa u istraživanjima cjepiva. Komparativnom studijom ustanovljeno je da prethodno navedena četiri cjepiva izazivaju kvantitativno različit humoralni odgovor, kao i stvaranje protutijela različite učinkovitosti prema varijantama SARS-CoV-2 virusa. (24) Stupanj učinkovitosti cjepiva protiv COVID-19 bolesti doveden je u korelaciju

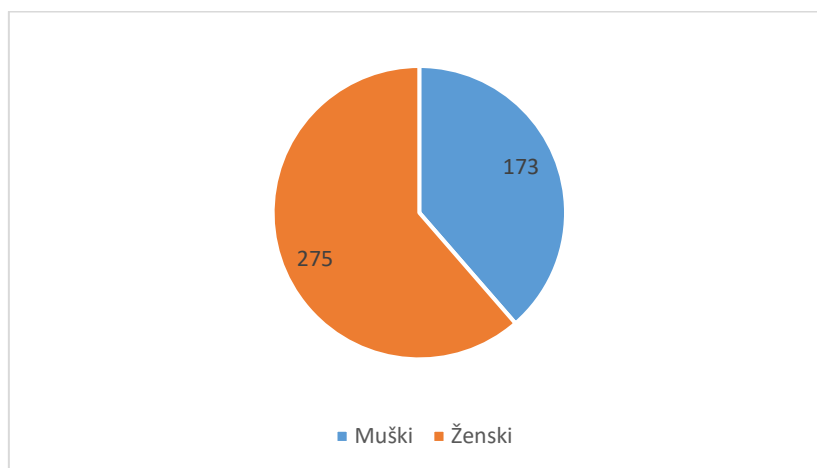
s jačinom humoralnog odgovora, koja se može kvantitativno izraziti razinom titra protutijela. (25) Četiri tjedna nakon primarnog cijepljenja najviši titar neutralizirajućih protutijela pronađen je u ispitanika koji su primili mRNA cjepiva, u usporedbi s nižim titrom izmjerenim u ispitanika koji su primili vektorska cjepiva. (24) Učinkovitost protutijela i njihova sposobnost neutralizacije varijanti u usporedbi s originalnim sojem virusa bila je snižena četiri tjedna nakon primjene sva četiri cjepiva, iako značajnije u slučajevima primjene vektorskih cjepiva. (24) Rana ispitivanja učinkovitosti cjepiva pokazala su >90% učinkovitost mRNA cjepiva protiv simptomatske infekcije u usporedbi s 60-70% učinkovitosti vektorskih cjepiva, uz visoku i podjednaku učinkovitost obe vrste cjepiva u prevenciji teškog oblika bolesti. (24) Titar neutralizirajućih protutijela koja imaju sposobnost neutralizacije trenutno vodeće Omicron varijante pokazao se značajno nižim nakon primovakcinacije u usporedbi s titrom nakon administracije booster doze ili dodatne izloženosti divljem soju virusa prije ili nakon cijepljenja. (26) Upravo iz toga proizlazi važnost globalne primjene treće booster doze i obnavljanja imuniteta u prevenciji širenja novonastajućih varijanti SARS-CoV-2 virusa.

2. SVRHA RADA

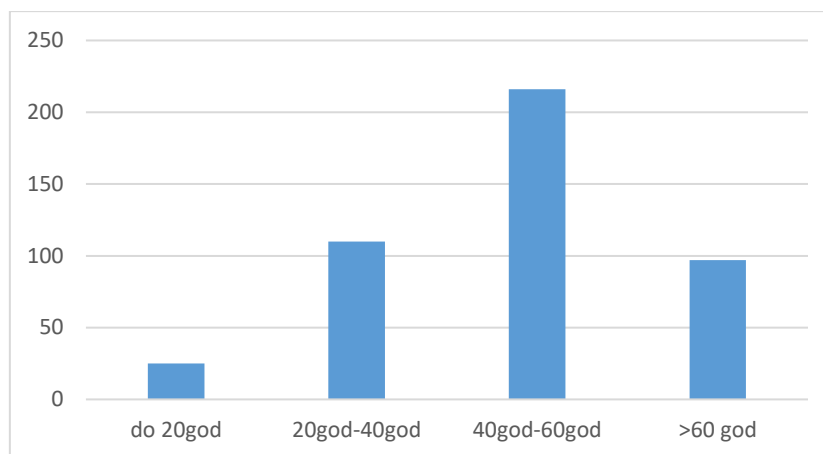
Svrha ovog diplomskog rada je usporediti prosječne vrijednosti titra IgG neutralizirajućih protutijela u različitim skupinama ispitanika. Skupine ispitanika bit će podijeljene prema dobi, spolu i prethodnoj izloženosti antigenima virusa, bilo preboljenjem bolesti ili/i cijepljenjem. Prikazat će dobivene prosječne vrijednosti protutijela u odnosu na vrstu primljenog cjepiva kao i broja primljenih doza. Prikazat će se i korelacije titra protutijela i vremena proteklog između datuma cijepljenja, preboljenja i serološkog nalaza. Cilj istraživanja je analizom humoralnog odgovora doprinijeti razumijevanju imunosti protiv virusa koji je uzrokovao globalnu pandemiju i promijenio viđenje infektivnih bolesti 21. stoljeća.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

Ova transverzalna studija sadrži nasumičan uzorak od 448 pacijenta Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo PGŽ u Rijeci, čiji su serološki nalazi učinjeni u periodu od 1. prosinca 2021. do 11. veljače 2022. godine. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (08-820-40/11-22) . Od ukupnog uzorka, 38,61% (173) su činili muškarci, a 61,38% (275) žene. (Slika 1) Medijan dobi među ispitanicima iznosio je 47 godina. 5,58% (25) ispitanika pripadalo je dobnoj skupini do 20 godina (uključujući), 24,55% (110) ispitanika dobnoj skupini 20 – 40 godina, 48,21% (216) ispitanika dobnoj skupini 40 – 60 godina, a 21,65% (97) dobnoj skupini starijoj od 60 godina. (Slika 2)



Slika 1 – raspodjela ispitanika po spolu

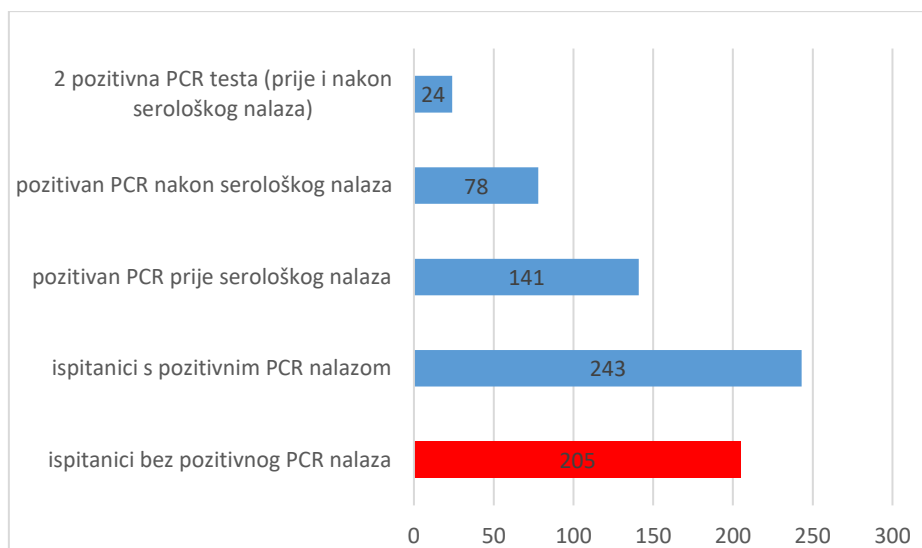


Slika 2 – Raspodjela ispitanika po dobi

Izuzev dobi, spola i IgG titra protutijela na SARS-CoV-2 virus, ova studija presjeka uključila je i varijable preboljenja dokazanog RT-PCR testom te podataka o cijepljenju odjela za Epidemiologiju NZZJZ PGŽ. Cijepljenje je promatrano kao uzrok dobivenih vrijednosti IgG titra protutijela, a pozitivni RT-PCR testovi kao uzrok ili posljedica dobivenih vrijednosti titra. Drugim riječima, analizirani podaci o cijepljenju datiraju nakon serološkog nalaza, dok analizirani podaci o pozitivnom RT-PCR testu datiraju i prije i nakon datuma serološkog nalaza. Cjepljeni ispitanici mogli su, ali i nisu morali imati pozitivan RT-PCR test, dok su necijepljeni ispitanici morali imati pozitivan RT-PCR test prije ili nakon serološke analize periferne krvi.

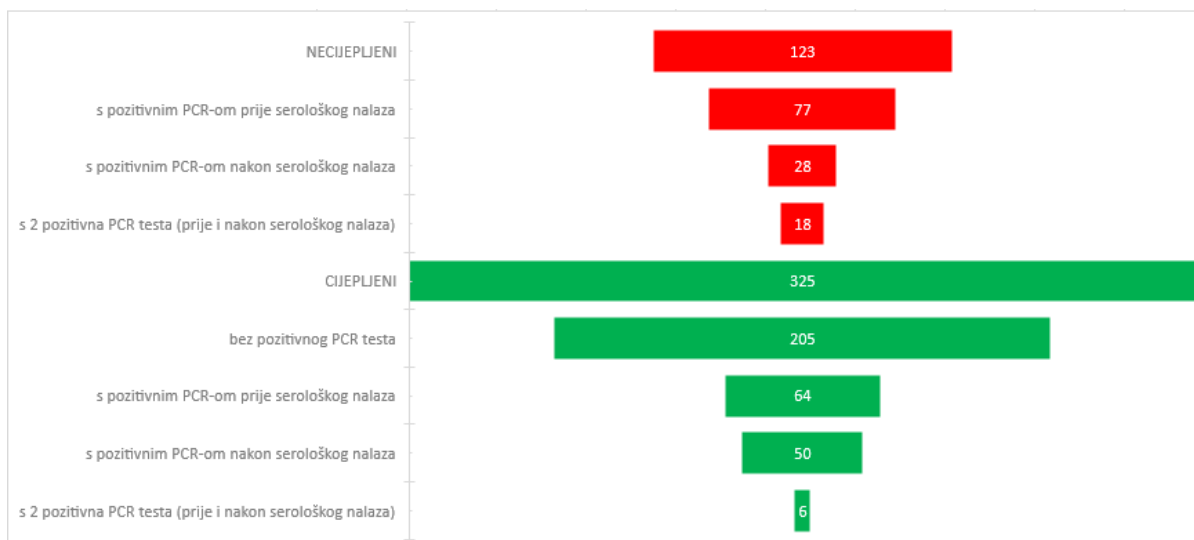
RT-PCR test je modifikacija RT-PCR testa koji se primjenjuje za otkrivanje ciljnih RNA u kliničkim uzorcima. Uzorak za testiranje se standardno uzima iz nazofarinksa te se potom uranja u transportni medij. Idući korak nakon transporta u mikrobiološki laboratorij jest ekstrakcija RNA, postupak kojim se iz uzorka koristeći različite kemijske otopine uklanjaju tvari poput lipida i proteina. Ekstrahirana RNA mješavina je genetskog materijala pacijenta i, ukoliko je prisutna, RNA virusa. Primjenom specifičnog enzima, reverzne transkriptaze, RNA se prepisuje u DNA. U uzorak se potom dodaju početnice (primeri), fragmenti DNA komplementarni određenim

dijelovima transkribirane virusne DNA. Real-time RT-PCR metoda koristi se primerima obilježenim fluorescentnom bojom. Nakon dodavanja primera, smjesa se stavlja u RT-RT-PCR stroj koji u ciklusima zagrijava i hladi smjesu čime se pokreću specifične kemijske reakcije koje stvaraju nove, identične kopije ciljanih dijelova virusne DNA. Standardna postavka RT-PCR-a u stvarnom vremenu obično prolazi kroz 35 ciklusa, što znači da se na kraju procesa stvara oko 35 milijardi novih kopija dijelova virusne DNA iz svakog lanca virusa prisutnog u uzorku. Kako se grade nove kopije virusnih dijelova DNA, primeri obilježeni fluorescentnom bojom se vežu na novosintetiziranu DNA, a zatim oslobađaju fluorescentnu boju koja se mjeri računalom stroja i prikazuje u stvarnom vremenu na ekranu. Na taj način omogućeno je praćenje amplifikacije DNA kroz porast intenziteta fluorescencije. Prijelaz određene razine fluorescencije potvrđuje prisutnost virusa, a što je manje ciklusa (CT) potrebno da se ta razina dosegne, to je više virusa u inicijalnom uzorku odnosno virusna infekcija je teža. (27) U 205 ispitanika (45,76%) infekcija nije dokazana RT-PCR testom, dok je 243 ispitanika (54,24%) imalo pozitivan RT-PCR test na SARS-CoV-2. (Slika 3) Od 243 ispitanika s pozitivnim RT-PCR testom, 141 (31,47%) ih je imalo jedan pozitivan test prije serološke analize, 78 (17,41%) jedan pozitivan test nakon, a 24 (5,58%) je imalo dva pozitivna RT-PCR testa, jedan prije i drugi nakon serološkog testa. Ukupno 102 ispitanika imala su dokumentiran pozitivan RT-PCR test nakon serološkog nalaza. (Slika 3)



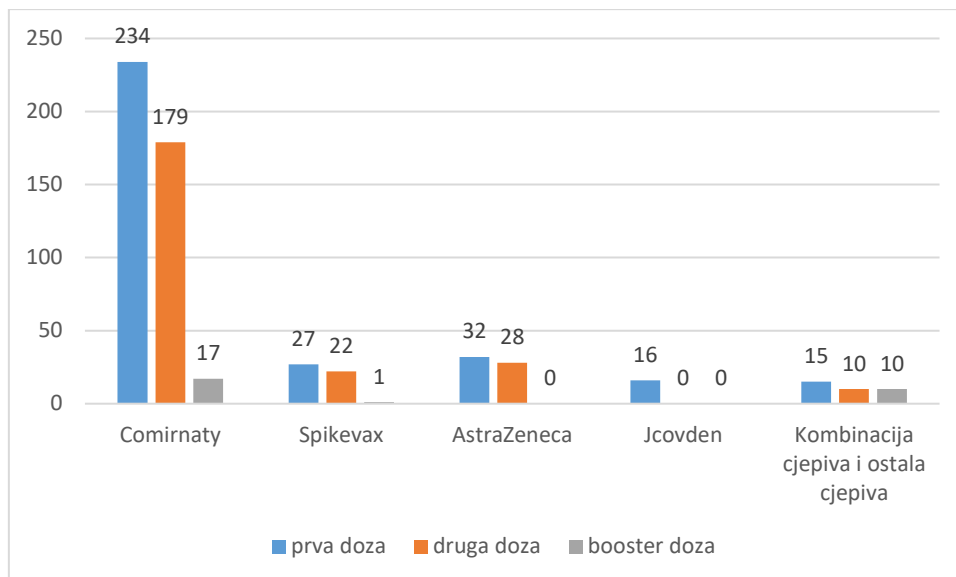
Slika 3 – PCR negativni i pozitivni ispitanici i podjela PCR pozitivnih prema serološkom nalazu

123 (27,46%) ispitanika nije bilo cijepljeno. Od necijepljenih ispitanika, 77 (62,60% necijepljenih) je imalo RT-PCR-om dokazano preboljenje prije serološkog nalaza, 28 (22,76% necijepljenih) je imalo RT-PCR-om dokazano preboljenje nakon serološkog nalaza, a 18 (14,63% necijepljenih) je imalo dva pozitivna RT-PCR testa, jedan prije i drugi nakon serološkog nalaza. (Slika 4) 325 ispitanika (72,54%) bilo je cijepljeno najmanje jednom dozom prije analize seruma, od kojih je 64 (14,29%) uz cijepljenje imalo RT-PCR-om dokumentirano preboljenje, odnosno imali su dvije izloženosti antigenu prije provedene serološke analize. 50 cijepljenih ispitanika (11,16%) imalo je pozitivan nalaz RT-PCR testa nakon provedene serološke analize, a 6 cijepljenih ispitanika (1,34%) je imalo dokumentirano dva preboljenja, prije i nakon serološke analize. (Slika 4)



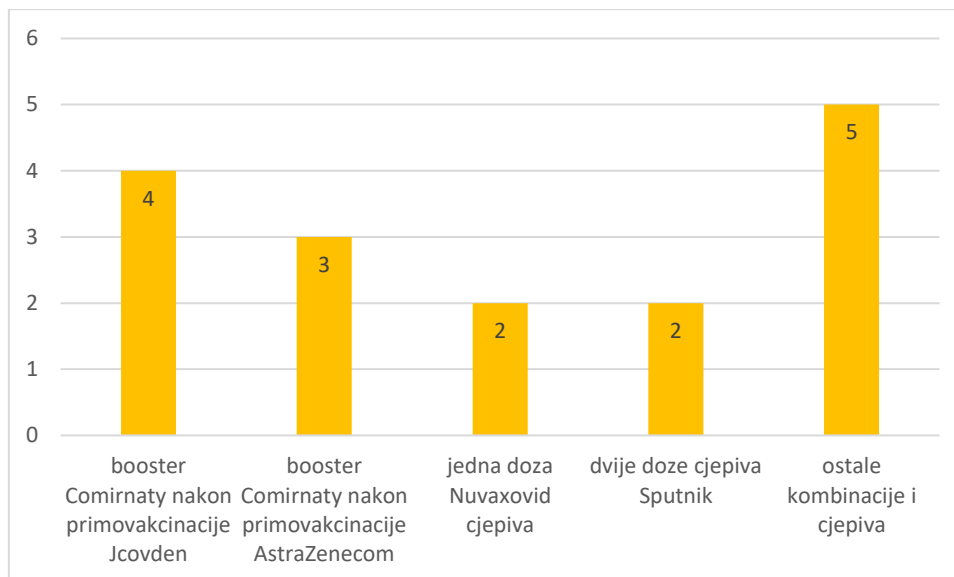
Slika 4 – Necijepljeni i cijepljeni ispitanici podjeljeni prema nalazima PCR testa

Promatrajući samo cijepljene ispitanike, isključivo Comirnaty cjepivo primio je 234 ispitanika (72% cijepljenih), od toga njih 234 (72%) prvu dozu, 179 (55,08% cijepljenih) drugu dozu i 17 (5,23%) booster dozu. Isključivo cjepivo proizvođača AstraZeneca primilo je 32 ispitanika (9,85% cijepljenih), od toga 32 ispitanika (9,85% cijepljenih) prvu, 28 ispitanika (8,62%) drugu, a booster dozu niti jedan ispitanik. Isključivo Spikevax cjepivo primilo je 27 ispitanika (8% cijepljenih), od toga 27 prvu dozu (8%), 22 drugu dozu (6,46%) i 1 (0,31% cijepljenih) booster dozu. Isključivo cjepivo Jcovden u obliku jedne doze primilo je 16 ispitanika. (4,93% cijepljenih). (Slika 5). Dva ispitanika (0,65%) cijepljena su jednom dozom Nuvaxovid cjepiva. Jedan ispitanik (0,31% cijepljenih) cijepljen je s dvije doze cjepiva Sinopharm. Dvoje ispitanika (0,62% cijepljenih) cijepljeno je s dvije doze cjepiva Sputnik. (Slika 6)



Slika 5 – Podjela cijepljenih ispitanika prema vrsti cjepiva i broju doza

Preostalih 11 cijepljenih ispitanika (3,38% cijepljenih) primilo je kombinaciju cjepiva: booster dozu cjepivom Comirnaty nakon završene primovakcinacije cjepivom Jcovden (1 doze) primila su 4 ispitanika (1,23% cijepljenih). Booster dozu cjepiva Comirnaty nakon završene primovakcinacije (prve i druge doze) cjepivom AstraZeneca primila su 3 ispitanika (0,92% cijepljenih). (Slika 6) Jedan ispitanik (0,31% cijepljenih) primio je booster dozu cjepivom Spikevax nakon završene primovakcinacije (dvije doze) Comirnaty cjepiva. Dva ispitanika (0,62% cijepljenih) nastavila su vakcinaciju Comirnaty cjepivom nakon primljene prve doze AstraZeneca cjepiva, od kojih je jedan (0,31%) primio Comirnaty cjepivo u obliku druge doze, a drugi (0,31%) u obliku druge doze i boostera. Nakon završene primovakcinacije cjepivom AstraZeneca (2 doze) booster dozu cjepivom Spikevax primio je 1 ispitanik (0,31% cijepljenih).



Slika 6 – ispitanici koji su primili ostala cjeviva ili kombinacije cjeviva

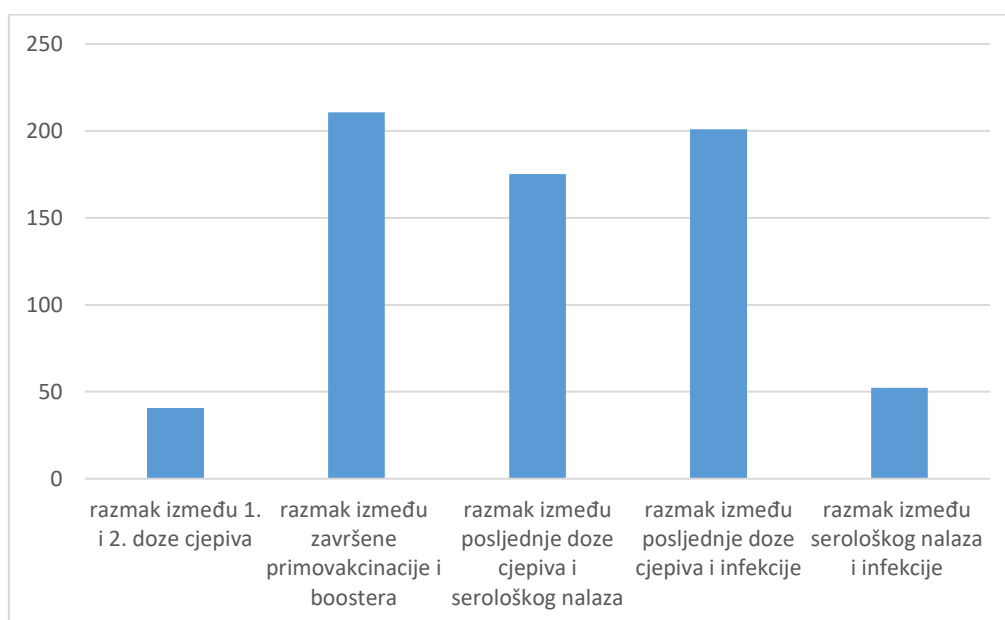
Jedan od ciljeva istraživanja bila je analiza parametra prosječne vrijednosti protutijela gore navedenih skupina ispitanika. 83,26% (373) uzoraka serološki je testirano kemiluminiscentnom mikročestičnom imunohistokemijskom metodom (engl. Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - CMIA) proizvođača Abbott Diagnostics, a preostalih 16,74% (75) uzoraka serološki je testirano enzimskim fluorescentnim imunotestom (engl. Enzyme Linked Fluorescent Assay – ELFA) naziva VIDAS anti-SARS-CoV-2, proizvođača bioMérieux. Testiranje uzorka plazme ili seruma kemiluminiscentnom mikročestičnom metodom provodi se u dva koraka na sljedeći način: u prvom koraku se uzorak pacijenta, razrjeđivač za analizu i paramagnetske mikročestice obložene SARS-CoV-2 nukleokapsidnim antigenom kombiniraju i inkubiraju. Ukoliko je u uzorku prisutno anti-SARS-CoV-2 IgG protutijelo, doći će do vezivanja protutijela i paramagnetskih čestica obloženih antigenom. Potom se smjesa ispire i u nju se dodaje anti-humani IgG konjugat obilježen akridinijem. Nakon inhubacije i drugog ciklusa pranja, dodaje se otopina pre-okidača, vodikov peroksid te potom otopina okidača, natrijev hidroksid. Otopina vodikovog peroksida odvaja akridinij od IgG konjugata koji je vezan na kompleks paramagnetskih

mikročestica. Dodavanje otopine okidača pokreće oksidacijsku reakciju akridinija, što proizvodi mjerljivu kemiluminiscentnu reakciju. Reakcija se mjeri u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), čija je količina u direktnoj korelaciji s količinom anti-SARS-CoV-2 IgG protutijela u uzorku. (28) Prisutnost ili odsutnost IgG protutijela određuje se dijeljenjem RLU uzorka s pohranjenim RLU kalibratora kako bi se pronašao indeks testa odnosno S/C omjer. (29) Ovisno o postavkama laboratorijskog informacijskog sustava, vrijednost indeksa može se prikazati zajedno s pozitivnim rezultatom kako bi se označila relativna jačina signala. (28) Cut-off vrijednost CMIA serološkog testa određena u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju iznosila je ≥ 50 .

Enzimski fluorescentni imunotest se temelji na tzv. sendvič metodi. Dodavanjem rekombinantnog SARS-CoV-2 šiljastog proteina u uzorak postiže se vezivanje protutijela i dodanog antigena ako su protutijela u uzorku prisutna. Potom se u smjesu dodaje anti-humani IgG ili IgM obilježen alkalnom fosfatazom, što dovodi do hidrolize supstrata odnosno protutijela vezanih u kompleks s rekombinantnim antigenom. Intenzitet fluorescencije proizveden hidrolizom supstrata proporcionalan je razini protutijela. Indeks se računa kao omjer između relativne vrijednosti fluorescencije (RFV) u uzorku i RFV dobivene za kalibrator (humanizirani rekombinantni anti SARS CoV2 igG ili IgM) i tumači se kao negativan (indeks <1) ili pozitivan (indeks ≥ 1). (30)

Kako bi se IgG titar protutijela dobiven CMIA i ELFA serološkim testom mogao komparirati i promatrati u istom kontekstu, napravljena je prilagodba vrijednosti. Medijan IgG vrijednosti dobivenih CMIA metodom bio je u prosjeku 100 puta veći od medijana IgG vrijednosti dobivenih ELFA metodom. Iz navedenog razloga, sve vrijednosti IgG dobivene ELFA metodom pomnožene su sa 100 prije analize i prikazivanja rezultata, to jest prosječnog titra protutijela različitih skupina ispitanika.

Slika 7 prikazuje u danima izražene prosječne razmake između datuma cijepljenja i/ili pozitivnog RT-PCR testa i serološkog nalaza. Prikazan je prosječni razmak između 1. i 2. doze cjeviva, prosječni razmak između završene primovakcinacije i boostera – kod jednodoznih cjeviva (Janssen) završenom primovakcinacijom se smatra jedna primjena doza tog cjeviva, dok kod Comirnaty, AstraZeneca i Moderna cjeviva primovakcinacija podrazumijeva primanje dvije doze cjeviva. Na slici je također prikazan prosječni razmak između posljednje doze cjeviva i serološkog nalaza, kao i prosječni razmak između posljednje doze cjeviva i infekcije za ispitanike inficirane nakon cijepljenja. Prikazan je i prosječni razmak između serološkog nalaza i infekcije u ispitanika koji su inficirani nakon provedenog serološkog testa.



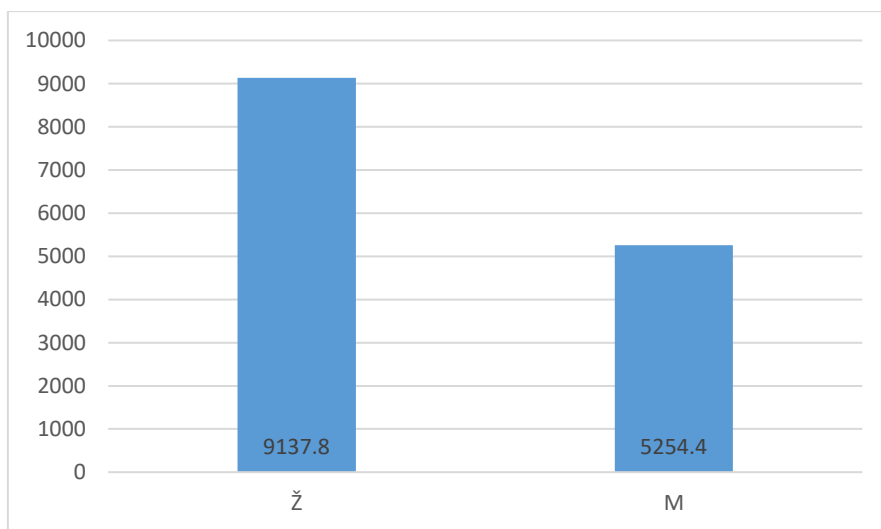
Slika 7 – prosječni razmaci između datuma cijepljenja, pozitivnog PCR testa i serološkog nalaza, izraženi u danima

Vrijednosti između navedenih datuma u danima korelirane su s vrijednostima titra protutijela. Originalne vrijednosti titra, odnosno vrijednosti navedene na nalazima seroloških testova korištene su u ispitivanju korelacija. Valja napomenuti i da su, u svrhu što točnijeg prikazivanja međusobne

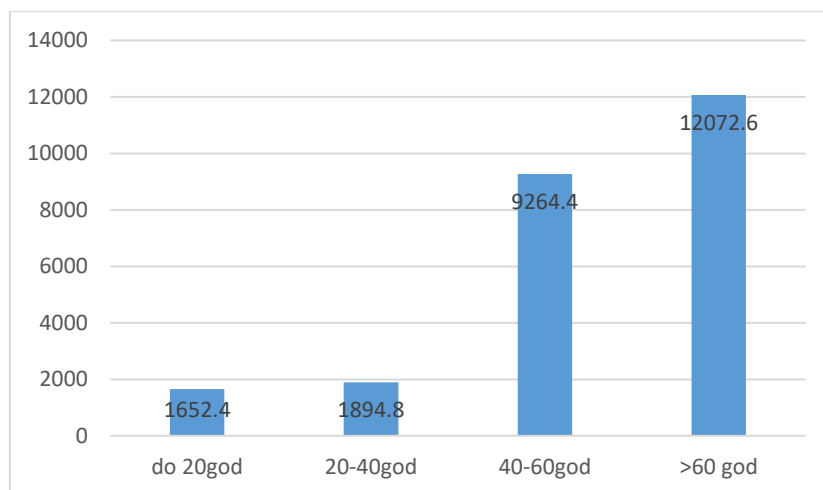
povezanosti navedenih varijabli, zasebno uzete IgG vrijednosti titra ispitanika testiranih CMIA i zasebno ispitanika testiranih ELFA metodom.

4. REZULTATI

Podjelom ispitanika samo na temelju spola, neovisno o cijepljenju ili preboljenju, uočeno je da prosjek protutijela u ženskih ispitanika (N=275) iznosi 9137,8, a prosjek protutijela u serumu muških ispitanika (N=173) 5254,4. (Slika 8) Prosjek protutijela u serumu ispitanika mlađih od 20 godina (N=25) iznosio je 1652,4, a prosjek protutijela u serumu ispitanika starosne dobi 20-40 godina (N=110) iznosio je 1894,8. Ispitanici starosne dobi 40-60 (N=216) godina imali su prosječno 9264,4 titar IgG protutijela u serumu, a ispitanici stariji od 60 godina (N=97) titar od 12072,6. (Slika 9)

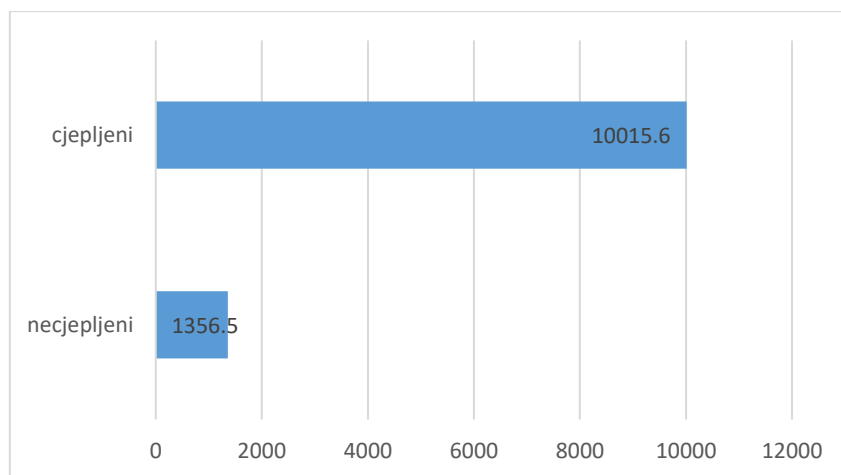


Slika 8 – prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu ovisno o spolu



Slika 9 – prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu prema dobnoj skupini

Podjelom ispitanika na cijepljene i necijepljene ustanovljeno je da prosjek IgG protutijela u serumu cijepljenih (N=325) iznosi 10015,6, a u serumu necijepljenih 1356,5. (Slika 10)

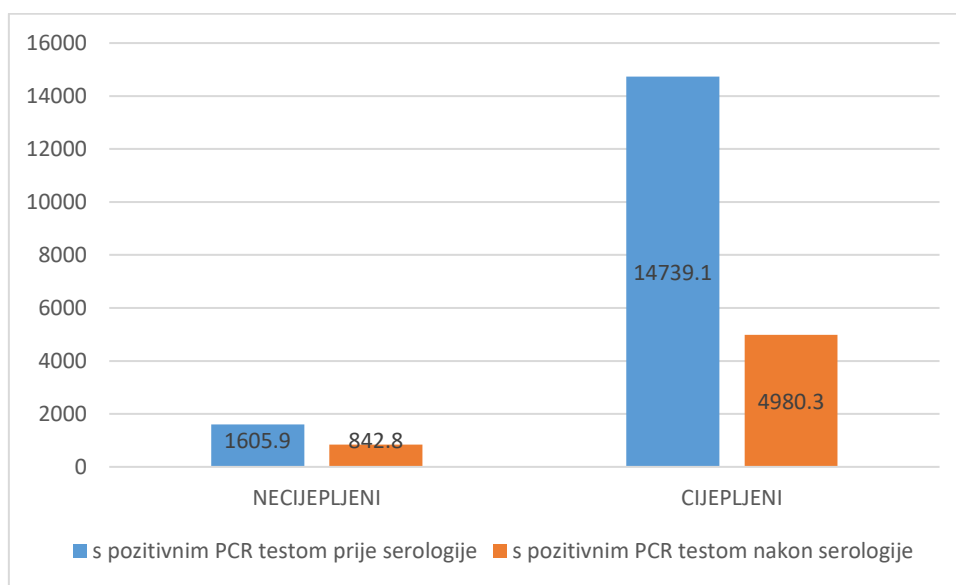


Slika 10 – prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu cijepljenih i necijepljenih

Ispitanici koji su imali pozitivan RT-PCR nakon serološkog nalaza (N=102), neovisno o cijepljenju, imali su prosječan titar protutijela u serumu 3098. 4 od 102 ukupno inficiranih nakon provedenog serološkog testa imali su maksimalan titar protutijela u serumu (>40 000).

Necijepljeni ispitanici (N=123) s pozitivnim RT-PCR testom prije serološkog nalaza (N=77) imali su prosjek protutijela u serumu 1605,9. Prosjek protutijela u serumu necijepljenih ispitanika koji su oboljeli nakon učinjenog serološkog nalaza (N=46) iznosio je 842,8. (Slika 11)

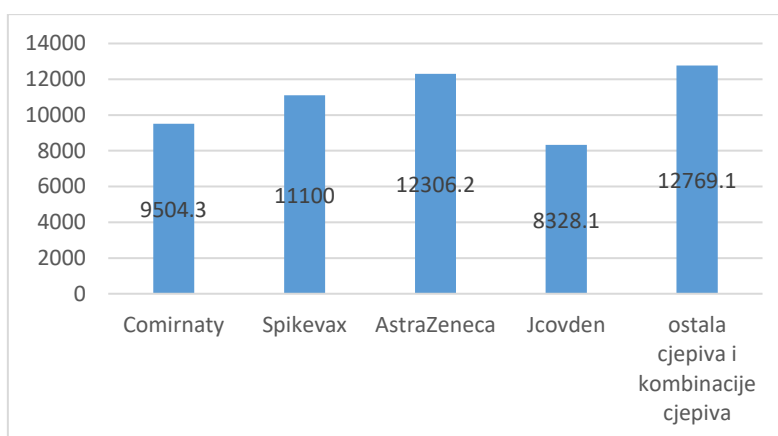
Cijepljeni ispitanici koji nisu imali preboljenje dokumentirano RT-PCR testom (N=205), imali su prosječan titar IgG protutijela 9750,7. Cijepljeni ispitanici koji su uz cijepljenje imali i dodatnu izloženost antigenu odnosno RT-PCR-om dokumentirano preboljenje prije serološke analize seruma (N=64) imali su prosječan titar IgG protutijela u serumu 14739,1. Cijepljeni ispitanici koji su inficirani nakon provedene serološke analize (N=56), imali su prosječan titar protutijela u serumu 4980,3. (Slika 11)



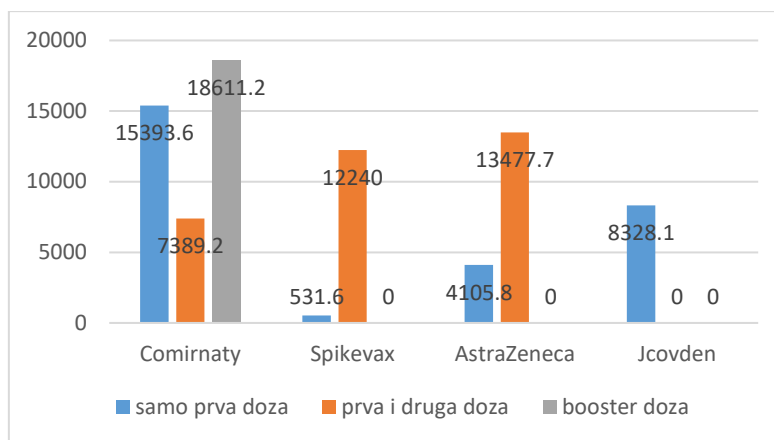
Slika 11 - prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu cijepljenih i necijepljenih s pozitivnim PCR testom prije i nakon serologije

Podjelom ispitanika na temelju vrsta primljenih cjepiva dobivene su prosječne vrijednosti protutijela u serumu ovisno o primljenom cjepivu. Tako je prosječni titar protutijela u serumu ispitanika cijepljenih isključivo Comirnaty cjepivom (N=234), neovisno o broju doza, iznosio

9504,3. (Slika 12) Ispitanici koji su primili samo prvu dozu (N=38) Comirnaty cjepiva imali su prosječni titar od 15393,6. Ispitanici koji su primili dvije doze (N=179) prosječni titar 7389,2 a ispitanici koji su uz dvije doze primili i booster Comirnaty cjepiva (N=17) prosječni titar od 18611,2. (Slika 13) Prosječni titar protutijela ispitanika cijepljenih isključivo Spikevax cjepivom (N=27), neovisno o broju doza, iznosio je 11100. (Slika 12) Ispitanici koji su primili samo prvu dozu Spikevax cjepiva ((N=5) imali su prosječni titar od 531,6, a ispitanici koji su primili obe doze tog cjepiva (N=22) imali su prosječan titar IgG protutijela u serumu od 12240. (Slika 13) Ispitanici koji su cijepljeni isključivo cjepivom AstraZeneca (N=32), neovisno o broju doza, imali su prosječni titar IgG protutijela u serumu 12306,2. (Slika 12) Ispitanici koji su primili samo prvu dozu AstraZeneca cjepiva (N=4) imali su prosječan titar protutijela u serumu 4105,8. Ispitanici koji su primili obe doze AstraZeneca cjepiva (N=28) imali su prosječan titar protutijela u serumu 13477,7. (Slika 13) Ispitanici koji su cijepljeni samo jednom dozom Jcovden cjepiva (N=16) imali su prosječan titar protutijela u serumu 8328,1. Prosječan titar protutijela u ispitanika koji su primili ostala cjepiva i kombinacije cjepiva, neovisno o broju primljenih doza (N=16), iznosio je 12769,1. (Slika 12)

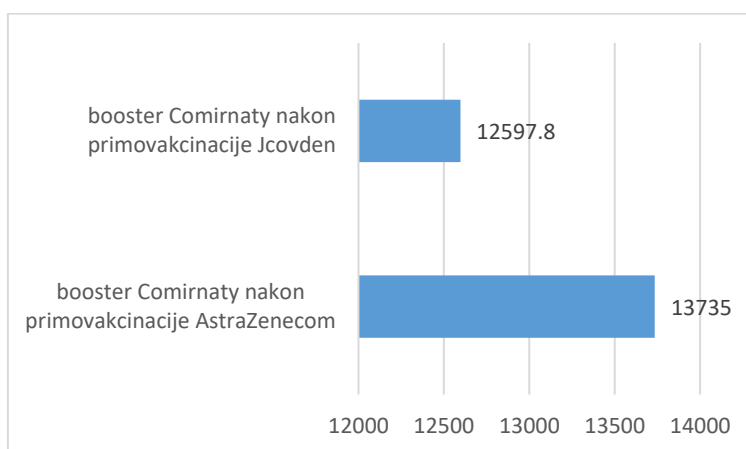


Slika 12 - prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu cijepljenih ispitanika ovisno o vrsti primljenog cjepiva, a neovisno o broju doza



Slika 13 - prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu cijepljenih ispitanika ovisno o vrsti primljenog cjepiva i broju primljenih doza

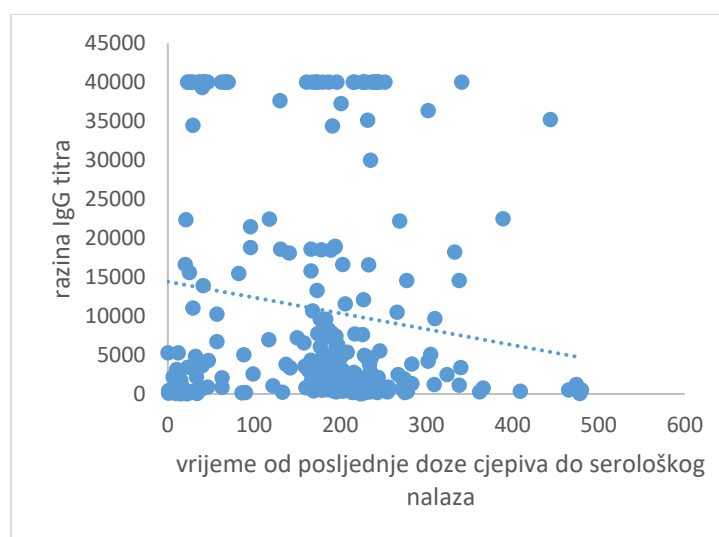
Ispitanici koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon primljene 2 doze cjepiva AstraZeneca (N=3) imali su prosječni titar protutijela u serumu 13735. Ispitanici koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon primljene 1 doze cjepiva Jcovden (N=4) imali su prosječni titar protutijela u serumu 12597,8. (Slika 14)



Slika 14 - prosječne vrijednosti IgG titra protutijela u serumu cijepljenih ispitanika koji su primovakcinirani ostalim cjepivima, a primili su Comirnaty booster

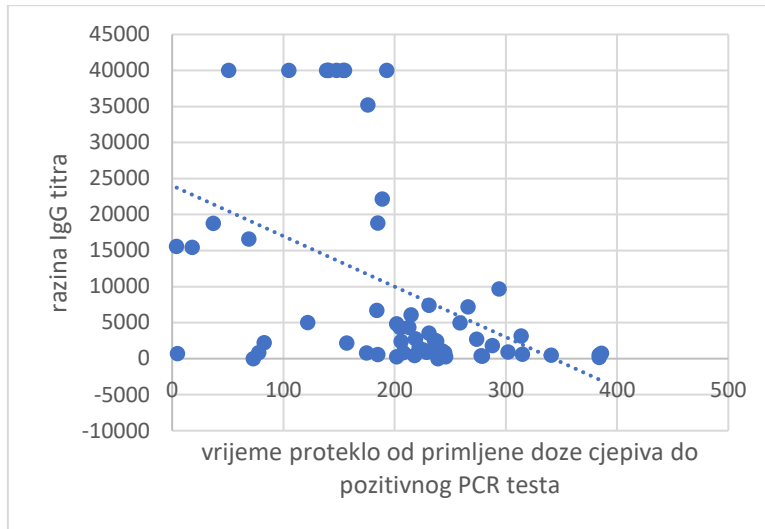
Ispitanici serološki testirani CMIA testom podijeljeni su u skupine i apsolutne vrijednosti IgG protutijela pojedinih skupina korelirane su s vremenom proteklom između datuma cijepljenja i testiranja u danima.

Vrijeme proteklo od posljednje doze cjepiva do serološkog nalaza bilo je u negativnoj korelaciji s titrom IgG neutralizirajućih protutijela s koeficijentom korelacije -0.13306. (N=266) Korelacija je bila statistički značajna ($p < 0,05$ $p = 0.03004$) Navedeno je prikazano na slici 15.



Slika 15 – grafički prikaz korelacije IgG titra (dobivenog CMIA testom) i vremena proteklog od posljednje doze cjepiva do serološkog nalaza

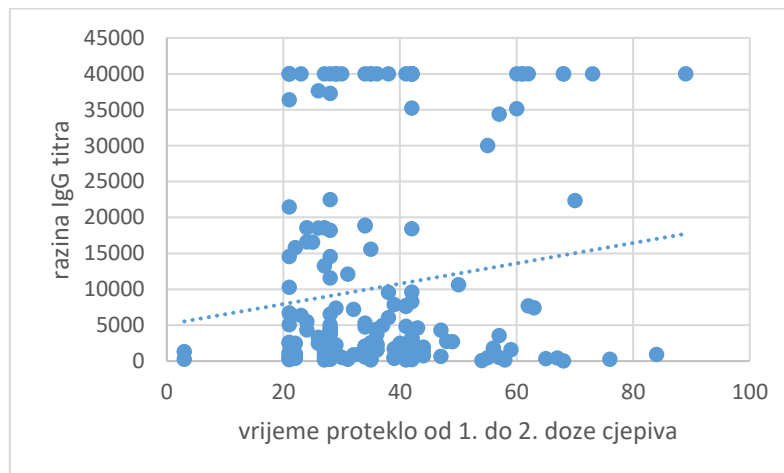
Slika 16 prikazuje negativnu korelaciju IgG titra i vremena proteklog od posljednje primljene doze cjepiva i infekcije, u ispitanika inficiranih nakon primitka najmanje jedne doze cjepiva (N=61). Koeficijent korelacije iznosio je -0.44016. i korelacija je statistički značajna ($p < 0.05$ $p = 0.00039$).



Slika 16 – grafički prikaz korelacije IgG titra i vremena proteklog od cijepljenja do infekcije

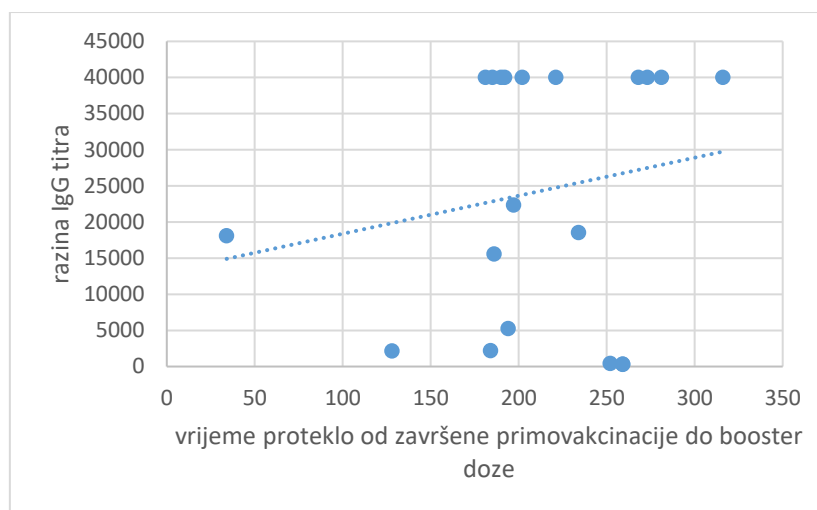
Vrijeme proteklo između 1. i 2. doze cjeviva u ispitanika koji su cijepljeni s dvije doze bilo je u pozitivnoj korelaciji s IgG titrom protutijela (N=210). Navedeno je prikazano na slici 17.

Koeficijent korelacije iznosio je 0.13095. Dobivena P vrijednost iznosila je 0.05815.



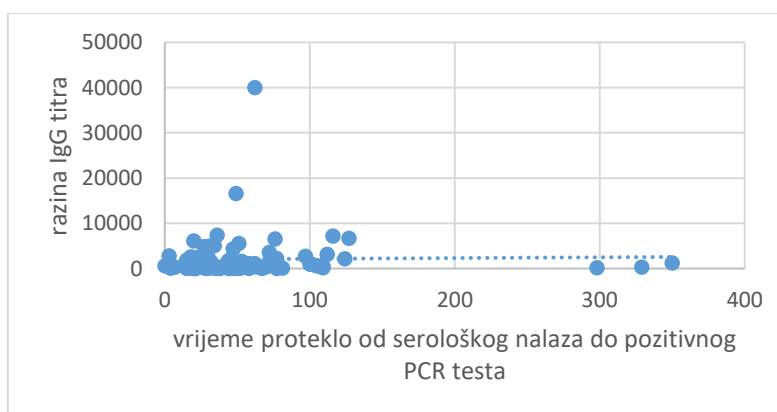
Slika 17 – grafički prikaz korelacije IgG titra i vremena od primitka 1. do primitka 2. doze cjeviva

Slika 18 prikazuje pozitivnu korelaciju IgG titra protutijela i vremena proteklog od završene primovakcinacije do primitka booster doze (N=20). Koeficijent korelacije iznosio je 0.18798, a korelacija nije bila statistički značajna. ($P > 0,05$, $P = 0,42739$).



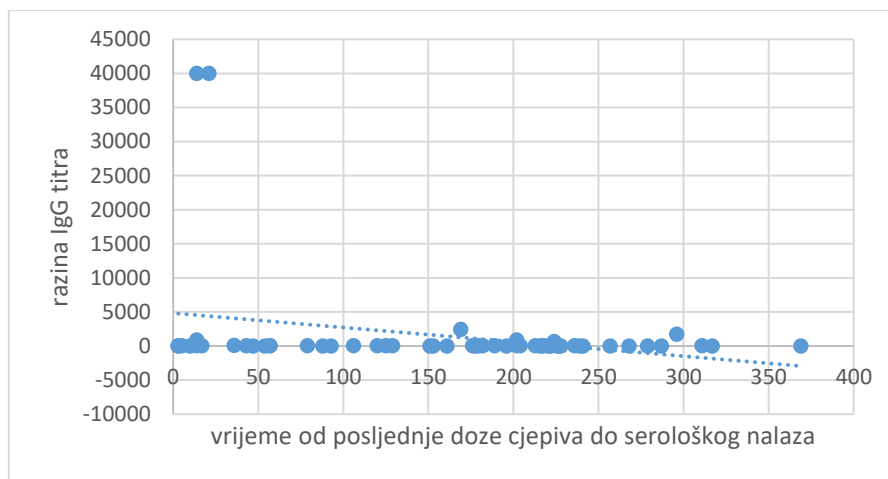
Slika 18 – grafički prikaz korelacije IgG titra i vremena od završene primovakcinacije do primitka booster doze

IgG titar protutijela i vrijeme proteklo od serološkog nalaza do infekcije, za ispitanike inficirane nakon serološkog nalaza (N=86) bili su u pozitivnoj korelaciji s koeficijentom korelacije 0,02088. Navedeno prikazuje slika 19. Korelacija nije bila statistički značajna. ($P > 0,05$, $P = 0,8487$).



Slika 19 – grafički prikaz korelacije IgG titra i vremena od serološkog nalaza do infekcije

U ispitanika testiranih ELFA metodom također je pronađena negativna korelacija između posljednje doze cjepiva i serološkog nalaza, prikazana na slici 20 (N=59). Koeficijent korelacije iznosio je 0,27555. Korelacija je bila statistički značajna. ($P < 0,05$, $P = 0,0347$).



Slika 20 – grafički prikaz korelacije IgG titra (dobivenog ELFA testom) i vremena proteklog od posljednje doze cjepiva do serološkog nalaza

5. RASPRAVA

Više prosječne vrijednosti protutijela u serumu ženskih ispitanika za oko 1,74 puta u usporedbi s muškim ispitanicima mogu se objasniti većim brojem ženskih ispitanika u cjelokupnom istraživanju, koji je iznosio 68,38% ukupnih ispitanika. (Slika 8) Obzirom je uzorak uzet nasumično, veliki postotak žena u uzorcima implicira da su žene sklonije podvrgavanju serološkim testovima, što je u skladu s činjenicom da se ženski spol općenito češće podvrgava dijagnostičkim testovima i više koristi usluge medicinske skrbi. (31)

Prosječne vrijednosti IgG protutijela u serumu ispitanika mlađih od 40 godina bile su slične, a prosječne vrijednosti ispitanika između 40-60 godina oko 5 puta veće. Najviše prosječne vrijednosti titra protutijela pronađene su u najstarijoj dobnoj skupini >60 godina, čime su prosječne vrijednosti protutijela pokazale rast obzirom na dob. Navedeno je prikazano na slici 9. Ovakav

trend protivi se istraživanjima po kojima stariji razvijaju slabiji imunosni odgovor na cijepljenje i time niže razine protutijela, te brže gube stvorena protutijela od mlađih. (32) Prosječne vrijednosti protutijela u serumu ispitanika starijih od 60 godina bile su čak 7,3 puta više od prosječnih vrijednosti protutijela u serumu ispitanika mlađih od 20 godina, što se može objasniti na nekoliko načina. Prvo, manji rizik COVID-19 komplikacija kod mlađih osoba je vjerojatno doveo do pogrešnog uvjerenja da cijepljenje za njih nije nužno, što je potencijalno utjecalo na dobnu raspodjelu cijepljenih na način da su većinsko cijepljeno stanovništvo stariji. Drugo, stariji ispitanici koji su oboljeli od COVID-19 bolesti u prošlosti vjerojatnije su imali težu kliničku sliku bolesti koja je po nekim istraživanjima u pozitivnoj korelaciji sa stupnjem dugotrajne imunosti i imunodne memorije. (33)

Cijepljeni ispitanici su imali oko 7,4 puta veće prosječne vrijednosti protutijela od necijepljenih koji su postigli serokonverziju samo na temelju preboljenja, što je vidljivo na slici 10. Iz navedenoga proizlazi da je cijepljenje učinkovitije od preboljenja u poticanju humoralnog odgovora, a time i neutralizacije SARS-CoV-2 virusa i njegovih varijanti. (34)

Prosječna vrijednost titra IgG protutijela u serumu 102 ispitanika koji su oboljeli nakon provedenog serološkog testiranja, neovisno o tome jesu li bili cijepljeni, iznosila je 3098 što je značajno niže od ostalih izračunatih prosjeka ovog istraživanja. Međutim, raspon vrijednosti protutijela u navedenih ispitanika bio je od 0 do maksimalne mjerljive vrijednosti 40000, s tri ispitanika koja su oboljela unatoč maksimalnom izmjerenom titru protutijela u serumu što čini definiranje granice protektivnog titra nemogućim i implicira da se apsolutna imunost ne može tumačiti samo na temelju razine protutijela u serumu. S druge strane, brojna istraživanja definiraju razine titra protutijela kao visoko prediktivne markere imunosti protiv SARS-CoV-2 virusa. (32, 34, 35)

Necijepljeni ispitanici koji nisu imali dokumentirano preboljenje prije serološkog testa, a inficirali su se nakon, imali su prosječnu vrijednost razine protutijela u serumu 842,8, što je ujedno najniža prosječna vrijednost titra protutijela dobivena u istraživanju. Ovakav rezultat bio je očekivan obzirom da u ovoj skupini ispitanika imunosni odgovor kao posljedicu konkretnog događaja (preboljenja ili cijepljenja) nije moguće definirati. Ostaje jedino pretpostaviti da su vrijednosti protutijela >0 ove skupine ispitanika posljedica humoralnog imunosnog odgovora nakon asimptomatske infekcije koja nije dokumentirana RT-PCR testom ili možda uslijed izloženosti virusu bez razvoja infekcije. U usporedbi s tim, cijepljeni ispitanici koji su se inficirali nakon provedene serološke analize imali su prosječne vrijednosti protutijela u serumu od 4980,3, što je oko 5,9 puta veće od prosječnih vrijednosti protutijela u serumu necijepljenih, što je prikazano na slici 11. Slika 11 također prikazuje ispitanike koji su primili barem jednu dozu cjepiva i uz to su imali pozitivan RT-PCR test prije provođenja serološke analize. Ova skupina ispitanika imala je vrlo visok prosjek protutijela u serumu, oko 1,5 puta veći od ispitanika koji su bili samo cijepljeni. Iz navedenog proizlazi da je jačina humoralnog imunosnog odgovora izražena razinom protutijela razmjerna broju izloženosti antigenu. Ovim se potvrđuje istraživanje Minervina A. i sur, kojim je dokazan porast razine protutijela u serumu ovisno o broju izloženosti antigenu na četiri skupine ispitanika: samo inficirani, samo cijepljeni, inficirani nakon jedne doze cjepiva i inficirani nakon dvije doze cjepiva. (36) Također, potvrđuje se važnost cijepljenja pacijenata koji su prethodno preboljeli COVID-19. U opservacijskim studijama pacijenata s prethodnom infekcijom, cijepljenje je povezano s nižim rizikom od naknadne ponovne infekcije, kao i s nižim rizikom prodorne infekcije u usporedbi s cijepljenim pacijentima koji nisu prethodno preboljeli. (37)

Analizom ispitanika koji su primili cjepivo, neovisno o broju doza, utvrđen je najviši prosječni titar protutijela u ispitanika koji su primili cjepivo AstraZeneca, od 12306,2. Prosječni titar za 1206,2

niži izračunat je u ispitanika koji su primili Spikevax cjepivo, za 2799,9 niži u ispitanika koji su primili Comirnaty, a za 3978,1 niži u ispitanika koji su primili Jcovden. (Slika 12). Međutim, navedeni podaci ne uzimaju u obzir broj primljenih doza već samo vrstu primljenog cjepiva, zbog čega se titar protutijela ne može promatrati u kontekstu završene primovakcinacije ili primljene booster doze. S druge strane, slika 13 prikazuje podjelu cijepljenih ispitanika obzirom na vrstu administriranog cjepiva i broja primljenih doza. Vidljivo je da je najviši prosječni titar protutijela izračunat u ispitanika koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon prethodno završene primovakcinacije Comirnaty cjepivom. Spomenuti titar je ujedno i najviši prosječni titar izračunat u istraživanju. U ispitanika cijepljenih s Comirnaty cjepivom vidljiv je trend opadanja prosječne vrijednosti protutijela u serumu nakon primanja druge doze i to oko 2,08 puta, da bi prosječna vrijednost potom opet porasla za 2,52 puta i tako dosegla maksimum nakon primanja booster doze. Također je vidljivo da su prosječne vrijednosti protutijela nakon prve doze Comirnaty cjepiva značajno veće od prosječnih vrijednosti nakon prve doze ostalih cjepiva i to oko 1,84 puta veće u usporedbi s jednom dozom cjepiva Jcovden, oko 3,75 puta veće u usporedbi s jednom dozom cjepiva AstraZeneca i oko 29 puta veće u usporedbi s jednom dozom Spikevax cjepiva. Uspoređujući ispitanike koji su primovakcinirani cjepivima Comirnaty, AstraZeneca, Spikevax i Jcovden, najviši prosječni titar protutijela u serumu utvrđen je nakon primovakcinacije cjepivom AstraZeneca. Neznatno niži titar, za 1237,7 utvrđen je u ispitanika nakon kompletne vakcinacije cjepivom Spikevax, a značajnije niži, za 5149,1 u ispitanika koji su primovakcinirani cjepivom Jcovden. Najniži prosječni titar od 7389,2 dobiven je u ispitanika primovakciniranih Comirnaty cjepivom. Slabiji humoralni imunski odgovor nakon primovakcinacije Jcovden cjepivom bio je očekivan obzirom da se radi o cjepivu koje se primjenjuje u jednoj dozi. S druge strane,

iznenađujuće su bile najniže vrijednosti prosječnog titra protutijela nakon primovakcinacije Comirnaty cjepivom u odnosu na vrijednosti nakon primovakcinacije ostalim cjepivima.

Navedenim se podupiru istraživanja humoralnog odgovora nakon cijepljenja po kojima su titri protutijela ispitanika cijepljenih s 2 doze Spikevax cjepiva viši u odnosu na titre ispitanika cijepljenih s 2 doze Comirnaty cjepiva. (37, 38) S druge strane, djelomično se opovrgavaju istraživanja po kojima je najviši titar neutralizirajućih protutijela pronađen u ispitanika koji su primovakcinirani mRNA cjepivima, u usporedbi s nižim titrom izmjerenim u ispitanika koji su primovakcinirani vektorskim cjepivima (24). Niže prosječne vrijednosti titra protutijela u ispitanika primovakciniranih Comirnaty cjepivom u usporedbi s ostalim cjepivima, kao i najviše prosječne vrijednosti titra protutijela izračunate u ispitanika koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon primovakcinacije Comirnaty cjepivom ukazuju na važnost primjene booster doze u poticanju humoralnog imunskog odgovora. Međutim, manjak ispitanika koji su primili booster doze ostalih cjepiva onemogućuje komparaciju humoralnog odgovora nakon booster doze Comirnaty cjepiva i ostalih cjepiva.

Nekoliko ispitanika primilo je booster dozu Comirnaty cjepiva nakon završene primovakcinacije drugim cjepivima. Dobivene prosječne vrijednosti protutijela su bile niže od prosječnih vrijednosti ispitanika koji su primovakcinirani cjepivom Comirnaty prije primanja booster doze Comirnaty cjepiva. (Slika 14, Slika 13) Ispitanici primovakcinirani cjepivom AstraZeneca imali su za 1137,2 više prosječne vrijednosti protutijela od ispitanika primovakciniranih cjepivom Jcovden, što govori u prilog jačem humoralnom odgovoru u ispitanika koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon što su primovakcinirani cjepivom AstraZeneca. (Slika 14)

Uz prethodno navedene, nedostatak u tumačenju prosječnih vrijednosti titra protutijela kojeg je također potrebno napomenuti jest nesrazmjer među cijepljenim ispitanicima: od cijepljenih ispitanika čak 72% bilo je cijepljeno Comirnaty cjepivom, što čini podatke dobivene analizom te skupine ispitanika najznačajnijima. 9,85% bilo je cijepljeno cjepivom AstraZeneca, 8% cjepivom Spikevax, a samo 4,9% cjepivom Jcovden, što donekle umanjuje važnost rezultata dobivenih analizom skupina ispitanika koji su primili isključivo ta cjepiva. Također, u istraživanju nije bilo moguće uzeti u obzir utjecaj pretpostavljenih izloženosti antigenu, odnosno infekcija koje nisu dokazane RT-PCR testom, na razinu protutijela u serumu.

Statistički značajna negativna korelacija između IgG titra i vremena proteklog od posljednje primljene doze cjepiva do serološkog nalaza ukazuje da što je više vremena prošlo između datuma cijepljenja i datuma serološkog testiranja, to je titar protutijela manji. Ovaj međuodnos titra IgG i vremena proteklog od cijepljenja je u skladu s već dokazanim učinkom pada titra neutralizacijskih protutijela tijekom vremena. (34, 35) Titar protutijela ispitanika koji su inficirani nakon cijepljenja je u statistički značajnoj negativnoj korelaciji s vremenom proteklim od cijepljenja do pozitivnog PCR testa. Drugim riječima, titar protutijela cijepljenih ispitanika koji su se inficirali je manji što je više vremena proteklo od posljednje doze cjepiva do infekcije. Osim što se ovom korelacijom dodatno podupire pojava pada titra protutijela s vremenom proteklim od cijepljenja, pozitivni PCR testovi ispitanika ukazuju da pad titra protutijela prati i smanjena imunost protiv SARS-CoV-2 virusa.

Vrijeme proteklo od primitka 1. do primitka 2. doze je u pozitivnoj korelaciji s titrom protutijela, odnosno što je više vremena proteklo između primitka dviju doza to je titar veći. Iako dobivena korelacija nije bila statistički značajna, dobivena je niska P vrijednost ($P=0,05815$) iz čega proizlazi da se pozitivan međuodnos tih varijabli može tumačiti s > 94% sigurnošću. Ovaj rezultat podupire

studije koje povezuju povećanje intervala između dvije doze primarne serije cijepljenja s jačim humoralnim odgovorom. (37) Otter A. i sur povezuju duže intervale između prve dvije doze s čak 9 puta višim titrom protutijela nakon druge doze. (39)

Ispitivana je i korelacija titra protutijela i vremena proteklog od završene primovakcinacije do primitka booster doze. Dobivena pozitivna korelacija upućuje da što je više vremena prošlo od primovakcinacije do boostera, to je humoralni odgovor jači. Ovaj rezultat, zajedno s rezultatom korelacije titra i vremena proteklog od prve i druge doze ukazuje da što više vremena prođe između primitka pojedinih doza cjepiva (doza primovakcinacije ili boostera) to je titar protutijela veći. Međutim, dobivena korelacija IgG titra i vremena proteklog od primovakcinacije do booster doze nije bila statistički značajna, zbog čega rezultat treba tumačiti s zadržkom. Također, nedostatak istraživanja na temu vremena proteklog od primovakcinacije do booster doze i odnosa tog vremena s titrom neutralizirajućih protutijela onemogućuje komparaciju rezultata s drugim studijama.

Titar protutijela ispitanika inficiranih nakon serološkog nalaza bio je u pozitivnoj korelaciji s vremenom proteklom od serološkog nalaza do infekcije. Iz navedenoga proizlazi da je titar protutijela veći što je više vremena prošlo od serološkog nalaza do pozitivnog PCR testa. Dobiveni rezultat nije u skladu s prethodnim rezultatima. Očekivani rezultat bio je suprotan, to jest očekivane su niže vrijednosti titra što je više vremena prošlo od serološkog nalaza do infekcije. Međutim, valja naglasiti da je koeficijent korelacije bio izrazito mali (0,02088), a P vrijednost velika ($P=0,8487$) zbog čega rezultat treba tumačiti s rezervom.

6. ZAKLJUČAK

Podjelom ispitanika prema spolu i dobi utvrđene su najviše prosječne vrijednosti titra protutijela u ženskih ispitanika i ispitanika starijih od 60 godina. Cijepljeni ispitanici imali su preko 7 puta veće prosječne vrijednosti protutijela u serumu od necijepljenih čiji je imunski odgovor isključivo posljedica preboljenja, iz čega proizlazi da je humoralni odgovor pokrenut cijepljenjem značajno učinkovitiji od humoralnog odgovora pokrenutog preboljenjem. Prosječni titar protutijela ispitanika cijepljenih barem jednom dozom, koji su oboljeli nakon serološkog testiranja, bio je 5,9 puta veći od prosječnog titra necijepljenih ispitanika koji su oboljeli nakon serološkog testiranja, čiji je prosječni titar ujedno bio najniži u istraživanju. Analizom apsolutnih vrijednosti titra protutijela u ispitanika oboljelih nakon serološkog testa nije bilo moguće definirati granicu protektivnog titra, obzirom da su inficirani i ispitanici kojima su izmjerene minimalne jednako kao i ispitanici kojima su izmjerene maksimalne vrijednosti titra protutijela u serumu. Iz navedenoga proizlazi zaključak da, iako je titar SARS-CoV-2 protutijela u serumu značajan prediktor imunosti, imunost prema SARS-CoV-2 virusu nije moguće definirati samo na temelju titra. Najviši prosjek protutijela u serumu imali su ispitanici koji su preboljeli COVID-19 i uz to su bili cijepljeni i to 1.5 puta veći od prosjeka protutijela ispitanika koji su bili samo cijepljeni. Iz navedenog proizlazi da je jačina humoralnog imunskog odgovora razmjerna broju izloženosti antigenu. Cijepljeni ispitanici analizirani su na temelju vrste primljenog cjepiva i broja doza. Promatrajući humoralni odgovor nakon prve doze, ustanovljene su značajno više prosječne vrijednosti protutijela nakon prve doze Comirnaty cjepiva u usporedbi s prosječnim vrijednostima protutijela nakon prve doze ostalih cjepiva. Analiza primovakciniranih ispitanika koji su primili dvije doze cjepiva (Comirnaty ili Spikevax ili AstraZeneca) ili jednu dozu Janssen cjepiva pokazala je najviše prosječne vrijednosti titra protutijela u ispitanika primovakciniranih AstraZenecom, nešto niže u ispitanika

primovakciniranih Modernom, a značajno niže u ispitanika primovakciniranih Janssen i Comirnaty cjepivom. Unatoč nižim prosječnim vrijednostima protutijela u serumu ispitanika primovakciniranih Comirnaty cjepivom u usporedbi s ostalim cjepivima, daleko najviše prosječne vrijednosti titra protutijela ustanovljene su u serumu ispitanika koji su primili Comirnaty booster nakon primovakcinacije Comirnaty cjepivom. Navedene prosječne vrijednosti bile su ujedno najviše prosječne vrijednosti protutijela dobivene u istraživanju, što implicira važnost primjene booster doze u poticanju humoralnog imunskog odgovora protiv SARS-CoV-2 virusa. Komparacijom prosječnih vrijednosti protutijela u ispitanika koji su primili Comirnaty booster nakon primovakcinacije drugim cjepivima ustanovljen je jači humoralni odgovor u slučaju primovakcinacije AstraZenecom u odnosu na primovakcinaciju Janssen cjepivom. Statistički značajne korelacije titra IgG protutijela i vremena proteklog između datuma cijepljenja, serološkog nalaza i pozitivnog PCR temelj su slijedećim zaključcima: titar IgG protutijela pada tijekom vremena, a što je manji IgG titar veća je vjerojatnost infekcije, to jest manja je imunost protiv SARS-CoV-2. Iako dobivena korelacija nije statistički značajna, s velikom vjerojatnošću se može zaključiti da je titar protutijela veći što je više vremena proteklo između primitka prve i druge doze cjepiva. S nešto manjom vjerojatnošću se može zaključiti i da je titar protutijela veći što je više vremena proteklo od primovakcinacije do primitka booster doze.

7. SAŽETAK

Istraživanje je uključilo analizu podataka seroloških nalaza, PCR testova te podataka o cijepljenju 448 pacijenata NZZJZ PGŽ. Izračunate su prosječne vrijednosti titra neutralizirajućih protutijela i komparirane u odnosu na dob, spol i prethodnu izloženost virusnim antigenima; preboljenjem, cijepljenjem ili oboje. Dobivene su više prosječne vrijednosti protutijela u serumu ženskih ispitanika i porast prosječnih vrijednosti protutijela razmjernan s dobi. Također su dobivene preko 7 puta veće prosječne vrijednosti protutijela u serumu cijepljenih u odnosu na necijepljene. Ispitanici koji su cijepljeni barem jednom dozom i uz to su imali preboljenje, imali su 1,5 puta veće prosječne vrijednosti titra od samo cijepljenih. Necijepljeni koji nisu imali preboljenje prije serološkog testa imali su najnižu prosječnu vrijednost protutijela dobivenu u istraživanju. Najviši prosječni titar protutijela dobiven je u ispitanika koji su primili booster dozu Comirnaty cjepiva nakon prethodne primovakcinacije Comirnaty cjepivom. Dobivene su statistički značajne korelacije između titra IgG neutralizirajućih protutijela i vremena proteklog od posljednje doze cjepiva do serološkog nalaza, te vremena proteklog od posljednje doze cjepiva do infekcije. Rađene su i korelacije IgG titra i vremena proteklog između prve i druge doze cjepiva te vremena između primovakcinacije i booster doze. Zaključci koji proizlaze iz navedenih rezultata i analize su: humoralni odgovor pokrenut cijepljenjem značajno je učinkovitiji od humoralnog odgovora pokrenutog preboljenjem, jačina humoralnog imunosnog odgovora razmjerna je broju izloženosti antigenu i važnost primjene booster doze u poticanju humoralnog imunosnog odgovora protiv SARS-CoV-2 virusa je neosporna. Titar protutijela pada tijekom vremena, a što je niži titar manja je imunost protiv SARS-CoV-2. S velikom vjerojatnošću se može zaključiti da je titar protutijela veći što je više vremena proteklo između primitka prve i druge doze cjepiva.

8. SUMMARY

This study included the analysis of serological findings, PCR tests and vaccination data of 448 NZZJZ PGŽ patients. Average values of neutralizing antibody titers were calculated and compared in groups of subjects divided by age, sex, and previous exposure to viral antigens that was documented with positive PCR test, vaccination data, or both. Higher mean antibody values in the serum of female subjects and an increase in mean antibody values proportional to age were obtained. Over 7-fold higher mean serum antibodies were found in the serum of vaccinated versus unvaccinated subjects. Subjects who were vaccinated with at least one dose and also had a positive PCR test had 1.5 times higher average titer values than those who were only vaccinated. Unvaccinated individuals who had not recovered prior to the serological test had the lowest average antibody value obtained in the study. The highest mean antibody titer was obtained in subjects who received a booster dose of Comirnaty vaccine after previous primovaccination with Comirnaty vaccine. Statistically significant correlations were obtained between the titer of IgG neutralizing antibodies and the passed time from the last vaccine dose to the serological finding, as the passed time from the last vaccine dose to infection. Correlations were also made between IgG titer and the time passed between the first and second vaccine doses and the time between primovaccination and booster dose. The conclusions derived from the results and the analysis are: the humoral response triggered by vaccination is significantly more effective than the humoral response triggered by the disease and multiple antigen exposures lead to stronger humoral immune response. Also, the role of booster dose in stimulating humoral immune response is undisputable. The antibody titer decreases over time, and the lower the titer, the lower the immunity against SARS-CoV-2. It can also be concluded with high probability that the higher the time passed between the first and second dose of the vaccine, the higher the antibody titer.

9. LITERATURA

1. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269. [Internet] 25.11.2020.[citirano 24.04.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723891/>
2. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Jan;23(1):3-20. [Internet] 05.10.2021. [citirano 24.04.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8491763/>
3. Kaur N, Singh R, Dar Z, Bijarnia RK, Dhingra N, Kaur T. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104490. [Internet] 01.08.2020. [citirano 24.04.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7395230/>
4. Tracking SARS-CoV-2 variants. WHO | World Health Organization [Internet]. [ažurirano 07.06.2022.; citirano 10.06.2022.]. Dostupno na: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
5. Duong, Diana. “Alpha, Beta, Delta, Gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern?.” *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* vol. 193,27 (2021): E1059-E1060. [Internet] 12.07.2021. [citirano 26.04.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8342008/>
6. Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 27, 601–615 (2021). [Internet] 22.03.2021. [citirano 26.04.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01283-z>

7. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 11;375(6585):1122-1127 [Internet] 11.03.2022. [citirano 27.04.2022.] Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abm8108>
8. Paludan SR, Mogensen TH. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. *Sci Immunol.* ;7(67):eabm5505. [Internet] 7.01.2022. [citirano 27.04.2022.] Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abm5505>
9. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol.*;15:493-518. [Internet] 24.01.2020. [citirano 05.05.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675482/>
10. Del Valle, D.M., Kim-Schulze, S., Huang, HH. et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* 26, 1636–1643 (2020). [Internet] 24.08.2020. [citirano 05.05.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-1051-9>
11. Galani, IE., Rovina, N., Lampropoulou, V. et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol* 22, 32–40 (2021) [Internet] 24.12.2020. [citirano 10.05.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41590-020-00840-x>
12. Lazzerini PE, Laghi-Pasini F, Boutjdir M, Capecchi PL. Cardioimmunology of arrhythmias: the role of autoimmune and inflammatory cardiac channelopathies. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jan;19(1):63-64. [Internet] 14.12.2018. [citirano 10.05.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41577-018-0098-z>
13. Bortolato B, Carvalho AF, Soczynska JK, Perini GI, McIntyre RS. The Involvement of TNF- α in Cognitive Dysfunction Associated with Major Depressive Disorder: An

- Opportunity for Domain Specific Treatments. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(5):558-76.
[Internet] 13.11.2015. [citirano 10.05.2022.] Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4761629/>
14. Huang C, Huang L, Wang Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet.* 2021;397(10270):220-232. [Internet] 8.01.2021. [citirano 15.05.2022.] Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7833295/>
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Innate Immunity. [Internet] 2002. [citirano 15.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Chapter 24, The Adaptive Immune System. [Internet] 2002. [citirano 15.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>
17. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021 Feb 18;184(4):861-880. [Internet] 18.01.2021. [citirano 20.05.2022.] Dostupno na:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7803150/>
18. Kasuga, Y., Zhu, B., Jang, KJ. et al. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Exp Mol Med* 53, 723–736 (2021). [Internet] 06.05.2021. [citirano 20.05.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s12276-021-00602-1>
19. Zohar T, Loos C, Fischinger S, Atyeo C, Wang C, Slein MD, Burke J, Yu J, Feldman J, Hauser BM, Caradonna T, Schmidt AG, Cai Y, Streeck H, Ryan ET, Barouch DH, Charles RC, Lauffenburger DA, Alter G. Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality. *Cell.* 2020 Dec 10;183(6):1508-1519.e12. [Internet]

03.11.2020. [citirano 20.05.2022.] Dostupno na:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420314598>

20. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, Belanger S, Abbott RK, Kim C, Choi J, Kato Y, Crotty EG, Kim C, Rawlings SA, Mateus J, Tse LPV, Frazier A, Baric R, Peters B, Greenbaum J, Ollmann Saphire E, Smith DM, Sette A, Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020 Nov 12;183(4):996-1012.e19. [Internet] 12.11.2020. [citirano 20.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7494270/>
21. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, Nakao C, Rayaprolu V, Rawlings SA, Peters B, Krammer F, Simon V, Saphire EO, Smith DM, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021 Feb 5;371(6529):eabf4063. [Internet] 06.01.2021. [citirano 23.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7919858/>
22. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Apr;17(4):261-279. [Internet] 12.01.2018. [citirano 23.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/>
23. Vanaparthi R, Mohan G, Vasireddy D, Atluri P. Review of COVID-19 viral vector-based vaccines and COVID-19 variants. *Infez Med*. 2021;29(3):328-338. [Internet] 10.09.2021. [citirano 23.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8805485/>

24. Van Gils MJ, Lavell A, van der Straten K, et al. Antibody responses against SARS-CoV-2 variants induced by four different SARS-CoV-2 vaccines in health care workers in the Netherlands: A prospective cohort study. *PLoS Med.* 2022;19(5):e1003991. [Internet] 22.07.2021. [citirano 25.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9113667/>
25. Earle KA, Ambrosino DM, Fiore-Gartland A, et al. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine.* 2021;39(32):4423-4428. [Internet] 17.05.2022. [citirano 25.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8142841/>
26. Wu M, Wall EC, Carr EJ, Harvey R, Townsley H, Mears HV, Adams L, Kjaer S, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, Kavanagh C, Queval CJ, Ngai Y, Hatipoglu E, Ambrose K, Hindmarsh S, Beale R, Gamblin S, Howell M, Kassiotis G, Libri V, Williams B, Gandhi S, Swanton C, Bauer DL. Three-dose vaccination elicits neutralising antibodies against omicron. *Lancet.* 2022 Feb 19;399(10326):715-717. [Internet] 19.01.2022. [citirano 25.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8769665/>
27. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013;530:67-74. [Internet] 12.09.2013. [citirano 25.05.2022.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124200371000026>
28. Manalac J, Yee J, Calayag K, et al. Evaluation of Abbott anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG and Euroimmun ELISA IgG/IgA assays in a clinical lab. *Clin Chim Acta.* 2020;510:687-690. [Internet] 08.09.2021. [citirano 26.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7476889/>

29. Nguyen NN, Mutnal MB, Gomez RR, et al. Correlation of ELISA method with three other automated serological tests for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240076. [Internet] 06.10.2020. [citirano 26.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7537879/>
30. 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. [Internet] 12.07.2020. [citirano 27.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7354376/>
31. Bertakis KD, Azari R, Helms LJ, Callahan EJ, Robbins JA. Gender differences in the utilization of health care services. *J Fam Pract*. 2000 Feb;49(2):147-52. [Internet] 2000. [citirano 27.05.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10718692/>
32. Naaber P, Tserel L, Kangro K, Sepp E, Jürjenson V, Adamson A, Haljasmägi L, Rumm AP, Maruste R, Kärner J, Gerhold JM, Planken A, Ustav M, Kisand K, Peterson P. Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Nov;10:100208. [Internet] 06.09.2021. [citirano 27.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8418937/>
33. Kusnadi A, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, Chee SJ, Meckiff BJ, Simon H, Pelosi E, Seumois G, Ay F, Vijayanand P, Ottensmeier CH. Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8⁺ T cells. *Sci Immunol*. 2021 Jan 21;6(55):eabe4782 [Internet] 21.01.2021. [citirano 27.05.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8101257/>

34. Yu, Y., Esposito, D., Kang, Z. et al. mRNA vaccine-induced antibodies more effective than natural immunity in neutralizing SARS-CoV-2 and its high affinity variants. *Sci Rep* 12, 2628 (2022). . [Internet] 16.02.2022. [citirano 02.06.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-06629-2>
35. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, Subbarao K, Kent SJ, Triccas JA, Davenport MP. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021 Jul;27(7):1205-1211. [Internet] 17.05.2021. [citirano 02.06.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01377-8>
36. Minervina, A.A., Pogorelyy, M.V., Kirk, A.M. et al. SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 23, 781–790 (2022) . [Internet] 05.04.2022. [citirano 02.06.2022.] Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41590-022-01184-4>
37. Edwards MK, Orenstein AW. COVID-19: Vaccines. U: UpToDate[Internet] [ažurirano: 06.06.2022.] [citirano 07.06.2022.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-vaccines>
38. Steensels D, Pierlet N, Penders J, Mesotten D, Heylen L. Comparison of SARS-CoV-2 Antibody Response Following Vaccination With BNT162b2 and mRNA-1273. *JAMA*. 2021 Oct 19;326(15):1533-1535. [Internet] 30.08.2021. [citirano 07.06.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8406205/>
39. Otter DA, D’Arcangelo S, Whitaker H et.. al. Determinants of SARS-CoV-2 anti-spike antibody levels following BNT162b2 vaccination: cross-sectional analysis of 6,000

SIREN study participants. [Internet] 21.04.2022. [citirano 07.06.2022.] Dostupno na:
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.04.21.22274025v1>

10. ŽIVOTOPIS

Sara Badovinac rođena je 08. prosinca 1996. godine u Rijeci. Osnovnu školu “Trsat” upisuje 2003., a završava 2011. godine. Od 2011. do 2015. godine pohađa opći smjer Prve sušačke hrvatske gimnazije u Rijeci koji završava s odličnim uspjehom. Nakon polaganja državne mature, upisuje Medicinski fakultet u Rijeci 2015.godine. Aktivno se služi engleskim, a pasivno talijanskim jezikom.



**NASTAVNI ZAVOD ZA
JAVNO ZDRAVSTVO**
PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE

adresa: Krešimirova 52a, 51000 Rijeka - Hrvatska
tel: + 385 51 358 777, fax: + 385 51 213 948
e-mail: ravmatelj@zzjzpgz.hr, www.zzjzpgz.hr
MB: 3393585, OIB: 45613787772
žiro nr: 2402006-1100369379, IBAN: HR9224020061100369379

Rijeka, 31.01.2022.


Broj: 08-820-40/11-22

Temeljem članka 6. i 7. Poslovnika o radu Etičkog povjerenstva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, na 24. sjednici Etičkog povjerenstva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije Rijeka, održanoj elektronskim putem od 17. siječnja 2022. do 28. siječnja 2022. godine jednoglasno je donesena

ODLUKA o odobrenju korištenja podataka

Korištenje i pristup podacima seroloških nalaza, nalaza PCR testova i cijepljenih statusa pacijenata Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, u svrhu izrade diplomskog rada pod nazivom: „Serološka analiza cijepljenih i preboljelih u Covid-19 epidemiji“ nije u suprotnosti s načelima medicinske etike te Etičko povjerenstvo jednoglasno daje odobrenje Sari Badovinac, studentici VI. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci za pristupom navedenim podacima uz pridržavanje načela medicinske etike i povjerljivosti podataka..

Predsjednica Etičkog povjerenstva:


DOLORES PERUĆ, dr.med.
specijalist medicinske mikrobiologije
s parazitologijom
0144282
Dr.sc. Dolores Peruć dr. med.

Dostaviti:

1. Sara Badovinac, 2x
2. Predsjednici Etičkog povjerenstva
3. Arhiva

Nastavni ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO
PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE
RIJEKA, Krešimirova 52/A
Mikrobiološki odjel 11



ispostave:

CRES: Turion 26, 51557 Cres, tel: 572 218 + **CRIKVENICA:** Kotorska 13a, 51260 Crikvenica, tel: 241 055
DELNICE: I. G. Kovačića 1, 51300 Delnice, tel: 811 925 + **KRK:** Vinogradska 2b, 51500 Krk, tel: 221 955
MALI LOŠINJ: D. Skopinića 4, 51550 Mali Lošinj, tel: 233 574 + **OPATIJA:** Stubište dr. V. Ekl 1, 51410 Opatija, tel: 718 067
RAB: Palit 143a, 51280 Rab, tel: 776 924

centri:

KOSTRENA: Glavani 89a, 51221 Kostrena, tel: 505 921 + **MATULJI:** Cesta dalm. brigada 30b, 51211 Matulji, tel: 554 123
VIŠKOVO: Marinići 9, 51216 Viškovo, tel: 499 515