

PRACA POGLĄDOWA/REVIEW PAPER

Ocena skuteczności szczepień przeciw COVID-19

Assessment of COVID-19 vaccination effectiveness

Ewelina Stoczyńska-Fidelus^{1,2,3}, Piotr Rieske^{2,3,4}

¹Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

²Celther Polska Sp. z o.o., Laboratorium Naukowo-Badawcze, Konstancinów Łódzki, Polska

³Personather Sp. z o.o., Konstancinów Łódzki, Polska

⁴Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

STRESZCZENIE

Szczepionki przeciwko COVID-19 są bardzo skuteczne. Wyniki badań nad szczepionkami w warunkach *in vitro* potwierdzają, że mają one wszystkie oczekiwane działania. Wzbudzają zarówno odpowiedź limfocytów cytotoksycznych, jak i odpowiedź humoralną. Wyniki badań w warunkach rzeczywistych wskazują na szybko słabnącą ochronę przed transmisją i bardzo dobrą ochronę przed zgonem i hospitalizacją. Najsłabiej badane są różnice między ozdrowieńcami a zaszczepionymi pacjentami. Oznaczenie, jaki jest poziom skuteczności szczepień, nie byłoby możliwe bez badań diagnostycznych o bardzo dobrej czułości i swoistości diagnostycznej. Diagnostyka i wyniki badań epidemicznych wykazały, że mechanizmy szybkiego wprowadzenia szczepień zostały wykorzystane. Niemniej przygotowania przed kolejną pandemią powinny uwzględnić różne mankamenty ujawnione przez COVID-19. Powinno się przykładowo rozważyć przygotowanie uniwersalnych szczepionek koronawirusowych, które jeśli nawet będą cechować się 25-procentową skutecznością w ochronie grup ryzyka przed hospitalizacją i 50-procentową przed śmiercią, okażą się bardzo pomocne, zanim zostaną opracowane szczepionki celowane.

SŁOWA KLUCZOWE

COVID-19, SARS-CoV-2, SPIKE, PCR, szczepionka.

ABSTRACT

The COVID-19 vaccines are very effective. *In vitro* studies of the vaccines indicate that the vaccines show all the expected effects. Vaccines induce both a cytotoxic lymphocyte response and a humoral response. Research under real conditions shows a rapidly weakening protection against transmission, and a very good protection against death and hospitalization. The differences between the convalescent and the vaccinated should be better analyzed. Determining the level of vaccination effectiveness would not be possible without diagnostic tests showing very good diagnostic sensitivity and specificity. Diagnostic analysis and epidemical analysis proved that mechanisms for the rapid introduction of vaccines have been accomplished. Nevertheless, preparations for the next pandemic should take into account the various shortcomings revealed by COVID-19. One should

consider the preparation of universal coronavirus vaccines. Even 25% effectiveness in protecting risk groups from hospitalization, and 50% from death, will prove very helpful before targeted vaccines are developed.

KEY WORDS

COVID-19, SARS-CoV-2, SPIKE, PCR, vaccine.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Piotr Rieske, Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, Polska, e-mail: piotr.rieske@umed.lodz.pl

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIEŃ W WARUNKACH LABORATORYJNYCH

Artykuły opierające się na danych laboratoryjnych można podzielić na oceniające, jaka jest zdolność wytworzonych w czasie szczepienia przeciwciał do neutralizacji wirusa SARS-CoV-2, oraz badające zdolności szczepionek do indukcji limfocytów cytotoksycznych (likwidujących komórki zainfekowane).

Skuteczność szczepionek oceniana w warunkach laboratoryjnych jest bardzo wysoka [1, 2]. Zdolność do wytwarzania przeciwciał neutralizujących wiriony SARS-CoV-2 miała większość pacjentów zaszczepionych [3]. W publikacjach tych zwrócono jednak uwagę na dwa niekorzystne zjawiska: 1) stopniowe zmniejszanie stężenia (miana) przeciwciał przeciwko białku kolca (SPIKE; S) wirusa, 2) nowe warianty wirionów SARS-CoV-2 zawierają białko kolca zmienione w sposób, który umożliwia uniknięcie interakcji z częścią przeciwciał wytworzonych po szczepieniu, jak również po przejściu infekcji (konwalescencja) innym wariantem, co wykazano także w innych pracach [4–6].

Odnosząc się do pierwszego zagadnienia, jest to sytuacja naturalna, obserwowana w przypadku większości szczepień i po infekcjach. Pokazuje jednak, że metody oceny, kto jest ozdrowieńcem albo u kogo miano przeciwciał chroni przed chorobą, mają wady. Liczy się funkcja tych przeciwciał, a nie tylko ich stężenie [7]; podobnie jak liczba nawet uśpionych producentów przeciwciał (limfocytów B, które ich tymczasowo nie uwalniają), ich repertuar i zdolność do szybkiej reakcji – mobilizacji. Takiej oceny nie daje się dokonać w czasie testów przesiewowych powszechnie stosowanych do wykrycia przeciwciał.

W przypadku drugiego zagadnienia tzw. ucieczka wirusa przed ochroną ze strony przeciwciał jest typowym zjawiskiem związanym z pojawianiem się nowych wariantów [6]. W ocenie zmienności białka SPIKE bardzo

często uwzględnia się jedynie sekwencję aminokwasów tego białka, podczas gdy to białko oraz białka kolca wielu innych wirusów są zmodyfikowane za pomocą reszt cukrowych (glikozylowane) [8]. Taką strategię stosowaną przez patogeny opisuje się w ramach popularyzacji biologii jako „wilk w owczej skórze” [9]. Utrudnia ona skuteczność działania przeciwciał. Bez wątplenia jednak zmiana aminokwasów białka SPIKE magnifikuje możliwość uniknięcia odpowiedzi wygenerowanej przez tę część układu odpornościowego. Zmiana aminokwasów ułatwia bowiem zmiany glikozylacyjne. Obserwowano to stopniowo w czasie pojawiania się kolejnych wariantów wirusa SARS-CoV-2 [10], przy czym wirus, unikając odpowiedzi humoralnej, może zmienić częściowo swój tropizm, tj. zdolność infekowania niektórych komórek. Prawdopodobnie zachodzi to w przypadku wariantu omikron, co prowadzi do zmniejszenia jego możliwości infekowania komórek płuc na korzyść górnych dróg oddechowych [11].

Po wynikach z testów *in vitro* można przewidywać, czy przeciwciała wytworzone przez ozdrowieńców lub osoby zaszczepione będą neutralizować wiriony. Ozdrowieńcy mogą posiadać przeciwciała nie tylko przeciw białku SPIKE, w obrębie którego występuje największa zmienność. Trzeba zauważyć, że rola przeciwciał odmiennych niż przeciwko białku S jest mniejsza. Białko SPIKE jest najbardziej immunogenne, ponieważ jest najbardziej ekspozowane w wirionie [12]. Stopniowe zmniejszenie stężenia przeciwciał oraz pojawianie się wariantów wirusa ze zmienionym białkiem, przeciwko któremu wycelowane są przeciwciała, są często nieuniknione ze względu na ewolucję wirusów.

Badania aktywności limfocytów cytotoksycznych niszczących komórki zainfekowane są o wiele trudniejsze niż badania przeciwciał, dlatego też publikacje na ten temat ukazują się znacznie rzadziej. Jest to jednak bardzo ważna część działania układu odpornościowego, ponie-

waż wirusy, takie jak SARS-CoV-2, przez większość czasu umiejscowione są, w przeciwieństwie do niektórych bakterii, wewnątrz komórek, czyli tam, gdzie przeciwciała nie docierają. Ponadto limfocyty cytotoksyczne są w zasadzie niewrażliwe lub w bardzo małym stopniu wrażliwe na glikozylację, gdyż proces prezentowania białek wirusa znajdującego się wewnątrz komórki ogranicza znaczenie glikozylacji, chociaż nie zawsze ją całkowicie eliminuje [10]. W badaniach dotyczących limfocytów cytotoksycznych wykazano, że pojawiają się one zarówno po przejściu infekcji, jak i po szczepieniu [13, 14]. Warto jednak zauważyć, że zdolność limfocytów cytotoksycznych do zapobiegania początkowej infekcji jest bardzo ograniczona. Można raczej mówić o ich roli w ograniczeniu rozprzestrzeniania się infekcji, ponieważ likwidują komórki wcześniej zainfekowane [15].

Badania nad limfocytami T są coraz bardziej zaawansowane i pokazują ciekawe różnice między zaszczepionymi, zainfekowanymi i tymi, którzy przeszli zarówno szczepienie, jak i infekcję. Oczywiście osoby tylko zaszczepione nie mają limfocytów T rozpoznających prezentowane przez MHC fragmenty innych niż SPIKE białek wirusowych, takich jak N czy M wirusa SARS-CoV-2, a ozdrowieńcy je posiadają. Białko S, jak już wspomniano, jest jednak najbardziej immunogenne, również dla limfocytów T. Pozostałe parametry wydają się zbliżone, przy czym wyniki badań pokazują, że najsilniejsze efekty odpornościowe obserwuje się u zaszczepionych ozdrowieńców [16, 17].

Co istotne, u ozdrowieńców po szczepieniu pobudzone są nie tylko limfocyty B i T odpowiedzialne za reakcję na białko SPIKE, lecz także cała sieć lub nisza komórek, które zostały u nich wyselekcjonowane i namnożone w czasie infekcji. Generalizując, pobudzanie całych ognisk germinałnych limfocytów jest strategią immunologiczną, która może powodować, że ozdrowieńcy po szczepieniu pobudzają również komórki skierowane przeciwko innym niż SPIKE antygenom SARS-CoV-2 [18, 19].

Badania *in vitro* mogą również ujawnić niekorzystne efekty działania przeciwciał, tzw. zjawisko wzmocnienia zależnego od przeciwciał (*antibody-dependent enhancement* – ADE) typu nasilenie infekcji lub zakaźności. W wyścigu zbrojeń między wirusami a układem odpornościowym niektóre wirusy zdobyły zdolność do wykorzystywania przeciwciał po to, żeby infekować komórki. Klasycznym przykładem jest wirus gorączki Denga [20]. W trakcie badań na zwierzętach nie wykryto tego zjawiska w przypadku SARS-CoV-2 [21, 22]. Szerzej problem ten omówiono w publikacji „Efekty niepożądane szczepień a potencjalne terapie przeciw COVID-19”.

Ostatni aspekt różnicujący ozdrowieńców i osoby zaszczepione to droga podania czynnika wywołującego od-

porność. Odporność miejscowa u ozdrowieńców, u których nie doszło do dysregulacji układu odpornościowego po chorobie, będzie lepsza, ponieważ miejscowo stężenie przeciwciał będzie wyższe. Nie oznacza się stężenia przeciwciał na powierzchni nabłonka dróg oddechowych, ale we krwi, co nie oddaje tej problematyki [23].

Podsumowując, wyniki badań *in vitro* oraz badań na zwierzętach wykazały przejściową bardzo dużą skuteczność szczepionek w indukcji odpowiedzi limfocytów B (produkcja przeciwciał) i limfocytów cytotoksycznych przeciwko SARS-CoV-2. Działanie w stosunku do wariantu omikron SARS-CoV-2 ocenia się na podstawie tych badań jako słabsze. Odpowiedź ozdrowieńców i zaszczepionych wydaje się podobna. Ozdrowieńcy mają szerszy repertuar limfocytów cytotoksycznych. Silniejsza odpowiedź występuje u zaszczepionych ozdrowieńców. Badania nie ujawniły efektu ADE, chociaż powinno się zachować czujność, czy kolejne warianty (po wariacie omikron) nie wykażą takiego zjawiska.

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIEŃ W WARUNKACH REALNYCH

Badania układu odpornościowego w warunkach *in vitro* są jednymi z najtrudniejszych i rodzących najwięcej wątpliwości. Badania laboratoryjne nie mogą zastąpić oceny działania szczepionek w świecie rzeczywistym. Układ odpornościowy działa z różnym nasileniem miejscowo u różnych osób, co ma duże znaczenie w przypadku chorób dróg oddechowych. Jak wskazano, ochrona przed infekcją stopniowo zanika, dlatego że utrzymywanie w pogotowiu idealnej ochrony przed infekcją każdego patogenu, z którym stykaliśmy się wcześniej, byłoby olbrzymim obciążeniem dla organizmu. Zwalczona wcześniej infekcja, dzięki szybkiej mobilizacji istniejących, ale wyciszonych tymczasowo komórek, z punktu widzenia organizmu nie stwarza dla niego z reguły konkretnego zagrożenia [24]. Ochrona przed niewielką infekcją jest bardzo trudna, szczególnie w przypadku wirusowych chorób dróg oddechowych lub ogólniej – takich, gdy transmisja odbywa się poprzez układ oddechowy. Trudno sobie wyobrazić, żeby przeciwciała całkowicie uniemożliwiły wirusom wniknięcie do komórek dróg oddechowych, zwłaszcza gdy ich dawka jest wysoka. Dlatego ważne jest utrzymanie nawet u zaszczepionych zasad DDM (dystans, dezynfekcja, maseczka). Dawka wirusa koreluje ze śmiercią bardziej niż wiek [25].

W trakcie badań klinicznych i szczepień populacyjnych szczepionką BNT162b2 (Pfizer) skuteczność przeciw infekcjom zmniejszyła się z 88% w pierwszym miesiącu (po pełnym szczepieniu) do 47% po 5 miesiącach. Ochrona szczepionki w zakresie hospitalizacji (przeciwko przyjęciom do szpitala z powodu infekcji) dla wszystkich

grup wiekowych była bardzo wysoka i wynosiła 93% (do 6 miesięcy) [26]. Należy jednak pamiętać, że skuteczność nie oznacza, że 88% zaszczepionych nie mogło się zakazić czy 93% zaszczepionych zachorować. Warto przypomnieć, w jaki sposób wyliczana jest taka skuteczność. Przykładowo, posługując się konkretnymi liczbami, w badaniu Pfizer brało udział 43 661 osób, które podzielono na grupę przyjmującą placebo oraz grupę zaszczepionych (około 21 830 osób w grupie). W grupie placebo – grupie, która otrzymała NaCl zamiast szczepionki – 162 osoby zostały zarażone koronawirusem i miały objawy. W grupie zaszczepionej liczba ta wynosiła 8. Według tych kryteriów oznacza to skuteczność rzędu 95%. Nie można obecnie ocenić skuteczności szczepień w trakcie badań klinicznych przez celowe poddawanie grupie zaszczepionej i niezaszczepionej wirusa. W czasie badań klinicznych konieczne jest oczekiwanie na spontaniczną infekcję, a ta nie obejmie w krótkim czasie wszystkich. Oznacza to, że pojęcie skuteczności szczepienia podczas badania klinicznego może odbiegać od tego obserwowanego w czasie szczepień populacyjnych, kiedy potocznie mówi się, że szczepienia chronią w 80% przed jakimś niechcianym zjawiskiem. Jest to w istocie tzw. skuteczność względna [27].

Do oceny skuteczności można posłużyć się innym parametrem, ale nie jest on tak znany. Można wykorzystać absolutne lub bezwzględne zmniejszenie ryzyka (*absolute risk reduction* – ARR). W tym przypadku skuteczność szczepionki to liczba osób, które trzeba zaszczepić (NNV), aby zapobiec jednemu przypadkowi COVID-19 jako 1/ARR w czasie np. pół roku. Wynosiło ono 81 dla szczepienia Moderna-NIH, 78 dla AstraZeneca-Oxford, 84 dla J&J i 119 dla Pfizer-BioNTech. Oczywiście im bardziej nasila się epidemia, tym niższa będzie ta wartość.

Można jeszcze zastosować inny parametr – ocenę, o ile razy mniejsze i większe jest ryzyko infekcji, hospitalizacji czy zgonu. W USA bardzo ogólnie obliczono, że od kiedy pojawił się wariant delta, ryzyko zakażenia jest 5 razy niższe wśród zaszczepionych, a hospitalizacji i śmierci 10 razy niższe. Były to dane za okres kwiecień–lipiec 2021 roku. Jest to bez wątpienia szacunek z założeniami dość niesprawiedliwymi (niekorzystnymi) dla szczepień, ponieważ nie uwzględnia podziału na grupy wiekowe [28].

Dokładniejsze dane z różnych krajów także nie zostawiają złudzeń co do skuteczności szczepień obserwowanej w ostatnich miesiącach 2021 roku. Według przykładowych danych ze stanu Waszyngton z końca 2021 roku wskaźniki wystąpienia COVID-19 wśród osób w wieku 35–64 lat były 4 razy wyższe w populacji niezaszczepionej niż w populacji w pełni zaszczepionej. Wskaźniki COVID-19 wśród osób w wieku 65+ były 7 razy wyższe w populacji niezaszczepionej niż w populacji w pełni zaszczepionej. Ryzyko hospitalizacji z powodu COVID-19 u osób w wieku 35–64 lata

było 18 razy wyższe w populacji niezaszczepionej niż w populacji w pełni zaszczepionej. Ryzyko hospitalizacji z powodu COVID-19 u osób w wieku 65+ było 13 razy wyższe w populacji niezaszczepionej niż w populacji w pełni zaszczepionej. Ryzyko zgonu na COVID-19 wśród osób w wieku 65+ było 15 razy wyższe w populacji niezaszczepionej niż w populacji w pełni zaszczepionej. W tym stanie nie oceniono różnic ryzyka zgonu w grupach młodszych ze względu na niewielką liczbę zgonów (link jest dynamiczny stale aktualizowany) [29]. Podobne dane można znaleźć w innych źródłach [30].

Badania modelowania matematycznego wskazują, że do połowy listopada 2021 roku szczepienia uratowały przed śmiercią około 500 tysięcy osób z europejskiego regionu WHO (lista państw tego regionu dostępna jest w publikacji Mesle i wsp. oraz w podanym linku) [31, 32]. Ze względu na szacunki wskazujące, że około 10–15% osób w szpitalach umiera, należy wnioskować, iż przed hospitalizacją udało się uratować około 3,5 miliona do 5 milionów osób.

Od początku badań wykazano także, że konieczne będzie „doszczepianie”. Jedynie koncern Johnson&Johnson zdecydował się na szczepienie jedną dawką. Badania *in vitro* sugerują niższą odporność po tym szczepieniu w dłuższym czasie [33]. Niemniej w zakresie ochrony przed hospitalizacją lub zgonem badania w warunkach realnych tego nie potwierdzają [34]. Pokazuje to, jaki jest rozdzźwięk między badaniami *in vitro* a badaniami w warunkach rzeczywistych. Dodatkowo ze względu na niekorzystną sytuację epidemiczną skrócono czas do kolejnego szczepienia (Moderna, Pfizer, AstraZeneca) do niezwykle krótkiego w porównaniu z innymi szczepieniami. Można się więc było spodziewać szybszego zaniku odporności na infekcję [26]. Typowy okres do zastosowania kolejnych dawek w wakcynologii jest znacznie dłuższy niż 2 tygodnie. Jedna dawka również nie jest typowa, ponieważ proces szczepienia przypomina proces zapamiętywania, a integracja pamięci układu odpornościowego rozciągnięta w czasie jest lepsza [35]. Tę zasadę obowiązującą w immunologii potwierdzają pierwsze badania dotyczące szczepień przeciwko COVID-19. Dłuższe interwały między szczepieniami zwiększają odporność [36]. W przypadku grypy u osób z grup ryzyka interwały roczne wydają się optymalne. Przy okazji warto jednak zwrócić uwagę, że w badaniach nad osobami zaszczepionymi nawet jedną dawką zaobserwowano korzystny efekt szczepień szczególnie w przypadku hospitalizacji i śmiertelności (uwaga plik jest aktualizowany) [29].

Wyniki badań pokazują, że nawet w tej grupie wiekowej (65+) osoby zaszczepione są zdecydowanie lepiej chronione niż niezaszczepione. Dodatkowo w tej grupie, szczególnie w ciągu pierwszych 3 miesięcy od szczepienia trzecią dawką, poprawia się odpowiedź (nie wiadomo na

jak długo), co można wykorzystać, kiedy zbliżają się tzw. fale zachorowań. Jednak w grupach wiekowych, które były najbardziej narażone na ciężki przebieg COVID-19, czyli m.in. właśnie wśród osób starszych, wystąpiła w czasie badań klinicznych niepełna ochrona [37]. Oczywiście nie jest niczym zaskakującym, że w niektórych grupach ryzyka szczepienia mają mniejszą skuteczność. To pokazuje, że np. profilaktyka powinna zaczynać się od zdrowego trybu życia. Wtedy szczepienia będą skuteczniejsze, a ryzyko wystąpienia takich chorób mniejsze [38–41].

Wariant omikron zmniejszył skuteczność szczepień szczególnie w przypadku infekcji. Ochrona przed hospitalizacją w stosunku do niezaszczepionych jest nadal bardzo dobra (wysoka) [42].

Perspektywicznie warto rozważyć badania nad szczepionką uniwersalną przeciwko różnym niebezpiecznym koronawirusom [43]. Prace takie rozpoczęto. Nie wiadomo jednak, czy białka uniwersalne będą dość skuteczne. Taką koncepcję podważa to, że dotychczas obecne w środowisku koronawirusy nie pozwoliły na wytworzenie dość skutecznej obrony, chociaż była i jest ona dyskutowana [44–46].

PORÓWNANIE OSÓB ZASZCZEPIONYCH Z OZDROWIEŃCAMI

Przedstawione powyżej statystyki mają pewien mankament – nie dokonują rozdziału na zaszczepionych ozdrowieńców i tylko zaszczepionych, nie podają także, ilu jest ozdrowieńców wśród niezaszczepionych. Jedynie w czasie badań klinicznych wyłączono ozdrowieńców zarówno z grupy szczepionych, jak i grupy otrzymującej placebo. Nie umożliwia to jednak stwierdzenia, na ile uwzględnienie ozdrowieńców w grupie szczepionych i niezaszczepionych zmienia ocenę skuteczności szczepień, podczas gdy w populacji jest coraz więcej ozdrowieńców.

Porównanie ozdrowieńców z osobami zaszczepionymi w czasie epidemii jest bardzo trudne. Najwięcej opublikowanych danych w tym zakresie pochodzi z Izraela. Wskazywano niekiedy na bardzo wysoką ochronę wynikającą z przejścia infekcji. Jednak – jak większość przytaczanych badań – także te pochodzą sprzed okresu, kiedy pojawił się wariant omikron SARS-CoV-2. Przykładowo, Gazit i wsp. wskazali na lepszą ochronę ozdrowieńców niż zaszczepionych BNT162b2, przy czym praca Gazita i wsp. jest recenzowana od sierpnia 2021 roku i nie ma pewności, że zostanie ostatecznie zaakceptowana [47]. Inne prace z Izraela odnoszące się do tej problematyki to bardzo skrupulatnie zebrane dane, które zostały opublikowane po recenzji. Autorzy wskazali na wysoką ochronę po przejściu infekcji, dodając jednocześnie bardzo silne wzmocnienie odpowiedzi u ozdrowieńców po szczepieniu. Potwierdzają to również ostatnie wyniki ba-

dań [48–50]. Rolę odpowiedzi układu odpornościowego ozdrowieńców podkreślają też badania przeprowadzone na ich komórkach [24, 51].

Gdyby wykluczyć ozdrowieńców z oceny grupy zaszczepionych, konsekwentnie powinno się wykluczyć ich z oceny grupy niezaszczepionych z uwagi na ich odporność naturalną (nabytą po infekcji). Nie wiadomo jednak, jakie są proporcje. Należy ponadto mieć na uwadze, że w przypadku odporności nabytej naturalnej mało prawdopodobne jest, że ktoś kto nie umarł w czasie pierwszej infekcji, kiedy nie miał jeszcze odporności nabytej, umrze w czasie drugiej infekcji, kiedy jakąś odporność wytworzył. To, czy ktoś umiera lub nie, nie zależy wyłącznie od tego, czy ma specyficzne przeciwciała lub limfocyty cytotoksyczne. Odporność ozdrowieńców w zakresie ochrony przed chorobą (objawy) wydaje się dość skuteczna, mimo że nawet 1/4 ozdrowieńców nie wytwarza przeciwciał (które jak wzmiankowano są niezłym markerem stanu odporności), szczególnie gdy są to osoby starsze i łagodnie przechodzące objawy [52]. Nie zmienia to wszystko faktu, że istnieje asymetryczne podejście do problemu danych. Gdy ocenia się skuteczność ozdrowienia w ochronie przed zachorowaniem, to usuwa się zaszczepionych spośród ozdrowieńców. Nie ma też problemu, żeby wskazać, czy ktoś otrzymał jedną, dwie lub trzy dawki i czy upłynęły 2 tygodnie od szczepienia. Wszystkie badania *in vitro* podkreślają natomiast, że zaszczepieni ozdrowieńcy to najprawdopodobniej najodporniejsza grupa. Powinno się więc ich usunąć z analizowanej grupy w ocenie skuteczności szczepień oraz konsekwentnie usunąć ozdrowieńców z grupy niezaszczepionych [16, 53].

Brak takiej oceny tylko częściowo usprawiedliwia fakt, że nie wszyscy ozdrowieńcy znajdują się w systemie tak jak zaszczepieni. Taką analizę (bez oficjalnych ozdrowieńców wśród zaszczepionych i niezaszczepionych) można przeprowadzić, wyraźnie informując o jej ograniczeniach. Bez takich danych próby analizy efektu ozdrowieńców wśród zaszczepionych mogą być skazane na ryzyko błędu. Niedługo analiza ta będzie jeszcze bardziej utrudniona z powodu pojawienia się wariantu omikron SARS-CoV-2, ponieważ infekcja ta nie zostanie oficjalnie odnotowana u wielu ozdrowieńców. W Karolinie Północnej (USA) zebrano wyniki stwierdzające, że około 90 osób ponownie zainfekowanych SARS-CoV-2 umarło w związku z COVID-19 [53]. Do czasu ukazania się tej publikacji umarło w tym stanie około 17 tysięcy osób. W lipcu w Karolinie Północnej zmarłych zaszczepionych było w sumie 5%, obecnie jest 10% wśród wszystkich zmarłych z COVID-19 [29, 54, 55]. Można więc szacować, że na 17 tysięcy zmarłych z COVID-19 od początku pandemii w tym stanie ponad 90 osób było ponownie zainfekowanych, a przynajmniej 800 zmarłych było zaszczepionych (5%). Nie oznacza to absolutnie, że

ozdrowieńcy są 10 razy lepiej chronieni niż zaszczepieni, ale potwierdza, że brak analiz, w których wyłącza się ozdrowieńców spośród zaszczepionych, jest niedopatrzeniem. Powyższy fragment tekstu obrazuje, że ta część analiz jest zaniedbana, ponieważ mimo usilnych starań nie daje się wyciągnąć konkretnych wniosków. Bardzo ważne jest również uwzględnienie tego, że infekcja to dla wielu osób trudny, a nawet brutalny test dla organizmu. Usunięcie ozdrowieńców ma również znaczenie dla oceny przebiegu epidemii w przyszłości. Podobnie powinno się wkrótce oceniać, jakie znaczenie ma przejście infekcji po szczepieniu. Umożliwiłoby to np. objęcie lepszą ochroną odpowiednich grup osób.

Dla każdej grupy (ozdrowieńcy, zaszczepieni, zaszczepieni ozdrowieńcy itd.) można wskazać różne aspekty. W przypadku ozdrowieńców występuje ekspozycja na zmienne dawki wirusa SARS-CoV-2 (w przeciwieństwie do stałej dawki w szczepionce), a następnie wirurgia osiąga różne poziomy w zależności np. od zmienności osobniczej, co prowadzi do odmiennych ekspozycji na antygeny. Powoduje to występowanie bardzo wysokiej heterogenności odpowiedzi. Odpowiedź u ozdrowieńców jest na pewno rozbudowana o to, w ilu organach znajdował się wirus, i ma szersze spektrum, jeśli chodzi o limfocyty Tc [56, 57]. Będzie ona inna u osób bezobjawowych, a inna u tych, którzy przeszli chorobę z ewidentnymi objawami. Podejrzewa się, że osoby, u których przebieg był najostrejszy, mogą nie wytwarzać adekwatnej odpowiedzi [58]. Na stan układu odpornościowego mają również wpływ zastosowane w czasie COVID-19 terapie, które mają niekiedy działania immunosupresyjne. Wszystko to powoduje, że ozdrowieńcy stanowią bardzo heterogenną grupę. Na korzyść tego typu odporności można wskazać, że poza SPIKE SARS-CoV-2 ma jeszcze inne białka, przeciw którym mogą powstać przeciwciała neutralizujące. Powstają one jednak rzadziej niż przeciwko SPIKE [12]. W przypadku ozdrowieńców powstają również niekiedy przeciwciała przeciwko białku N, jednak ich rola jest trudna do zdefiniowania. Nie mogą one być zbyt skuteczne w neutralizacji wirionów, ponieważ białko N znajduje się wewnątrz kapsydu. Można domniemywać, że mogą one odgrywać rolę w tworzeniu niekorzystnych kompleksów antygen–przeciwciała [59]. U ozdrowieńców natomiast powstaje szerszy repertuar odpowiedzi zależnej od limfocytów cytotoksycznych. Ich generację u ozdrowieńców może umożliwić nawet 20 białek, a nie jedno jak u zaszczepionych. Odgrywa to ważną rolę przy pojawianiu się nowych wariantów, ponieważ trudniej wirusowi zmienić 20 białek niż jedno [60].

W przypadku osób zaszczepionych proces immunizacji jest lepiej kontrolowany i oczywiście bezpieczniejszy. Możliwe jest doszczepienie w wybranym przez daną osobę terminie, jeśli np. wie, że będzie się narażać na kon-

takt z chorymi, jak również chce zwiększyć bezpieczeństwo swojego otoczenia w określonym krótkim czasie, np. 2 miesiące od szczepienia, kiedy istnieje większa ochrona przed infekcją. Jest to bardzo ważne w przypadku medyków w czasie np. fal zachorowań.

W rozważaniach nad infekcją i chorobą należy przypomnieć, że zakres ochrony zależy nie tylko od ogólnego stanu zdrowia osoby czy stężenia przeciwciał, lecz także od tego, z jaką dawką wirusa, liczbą wirionów się ona styka (*viral load*). Jeśli ryzyko inhalacji dużej dawki jest większe, to większe jest również ryzyko infekcji, a także choroby. Dawka wirusa koreluje w przypadku COVID-19 ze śmiertelnością bardziej niż wiek [25].

Niektórzy podważali konieczność stosowania trzeciej dawki, sugerując, że więcej pożytku przyniosłoby przekazanie szczepionek do krajów słabo rozwiniętych. Zdaniem krytyków tzw. busterów ryzyko wystąpienia niepożądanych odczynów poszczepiennych (NOP-ów) w stosunku do korzyści przy 3 dawkach może zacząć przechylać się powoli na niekorzyść szczepień. Według Krause i wsp. nadrzędnym celem szczepienia jest ochrona przed ciężkim przebiegiem, a na czas publikacji nie było dowodów, że taka dawka na to wpływa. Artykuł został opublikowany, zanim znany był wpływ „busterów” na przeżycie i pojawił się wariant omikron [61]. Nie przekonuje tutaj ochrona, którą mogłyby dać szczepienia przed *long* COVID-19, bo nie ma pewności, czy takowa istnieje dzięki szczepieniom. Ostatecznie wydaje się, że dokonano pewnego kompromisowego kroku w kierunku personalizacji, obniżając trzecią dawkę o połowę [62]. Autorzy publikacji obawiali się również pojawienia się kolejnego, bardzo groźnego wariantu w państwach słabo rozwiniętych. Nie wiadomo, jakie byłyby ich wnioski, gdyby wiedzieli, że pojawi się wariant omikron. Jest to sytuacja, która prowadzi do skrajnych przewidywań. Nie wiadomo również, jak długo będzie występowała ochrona po trzeciej dawce. Wiadomo jednak już dość dokładnie, kto jest narażony na kolejne zachorowania pomimo szczepienia. Są to np. osoby starsze [63]. Ogólne doświadczenie wakcynologiczne sugeruje, że taka dawka poprawia znacznie ochronę przed chorobą na dłuższy czas, szczególnie że nie jest podawana w odstępie 2 tygodni, ale tym razem więcej niż kilku miesięcy [64]. Skuteczność takiego podejścia potwierdzają pośrednio badania zaszczepionych ozdrowieńców. Dwutygodniowy odstęp dla szczepionek mRNA i AstraZeneca był podyktowany tym, żeby jak najwcześniej osiągnąć ochronę w czasie pandemii, skrócić czas badań klinicznych i nie powodować napięć społecznych dotyczących tego, czy ktoś osiągnął status osoby zaszczepionej.

Powoływanie się na powyższe badania (opublikowane przez Krause i wsp. w *Lancet*) ma różne znaczenie w odrębnych grupach zawodowych i różnych okresach

epidemii. Traktowanie ich jako argument przeciwko obowiązkowemu szczepieniu medyków w czasie zbliżającej się fali zakażeń może być podważony. Medycy dzięki szczepieniom mogą (przynajmniej przejściowo) chronić nie tylko siebie, lecz także swoich pacjentów. Nawet jeśli odporność na zakażenie trwa 2 miesiące i obejmuje 30% medyków, zaszczepienie ich trzecią dawką może zdecydowanie poprawić sytuację ich pacjentów, którzy są starsi i mają choroby zwiększające prawdopodobieństwo ciężkiego przebiegu COVID-19. Wśród pacjentów będących osobami starszymi jest zapewne więcej tzw. *non-responders*, czyli osób, które nie uodporniają się po szczepieniu. Jest również więcej osób, które nie zaszczepiły się z powodów osobistych lub dlatego, że należą do grup, w których szczepienie jest przeciwwskazane.

Sądząc po danych z badań *in vitro*, ozdrowieńcy zyskują dzięki szczepieniom lepszą ochronę przed ponowną infekcją niż zaszczepieni dwoma dawkami lub ozdrowieńcy niezaszczepieni [65].

Odporność osób starszych jest oczywiście fundamentalnym problemem wakcynologii, ponieważ bardzo trudno w organizmach osób starszych wytwarzać komórki zwalczające bardzo skutecznie nowe patogeny [66]. Układ odpornościowy tych osób bazuje na odporności przeciwko różnym patogenom, którą nabył w ciągu całego życia, a tzw. komórki naiwne mobilizowane są powoli. Dlatego każda nowa choroba infekcyjna dróg oddechowych będzie najpewniej stanowiła największe zagrożenie dla tej grupy osób, a szczepienia będą dla nich mniej skuteczne niż w młodszych grupach wiekowych. Słaba lub krótkotrwała ochrona przed infekcją jest dużym problemem. Osiągnięcie poszczepiennej odporności populacyjnej jest więc prawie nieosiągalne [67, 68]. Problem ten występuje również u ozdrowieńców. Pokazały to np. dane z Danii, gdzie zaobserwowano większe ryzyko ponownej infekcji po 65. roku życia [69].

Jedne z pierwszych badań potwierdzające występowanie ponownej infekcji wykonano u pracowników medycznych, jeszcze podczas dominacji wariantu alfa SARS-CoV-2. Łatwo je było przeprowadzić, ponieważ pracowników tych systematycznie testowano, aby nie zagrażali swoim pacjentom. Istnieje domniemanie, że grupa ta może być bardziej narażona na reinfekcje ze względu na kontakt z większymi dawkami wirusa. Ponowne infekcje wydają się ogólnie łagodniejsze, jednak część osób ponownie zainfekowanych umiera (0,03%). Ciągłe oczywiście dane te dotyczą wariantów innych niż SARS-CoV-2 omikron [70].

Zagadnienie, które jest słabo rozpoznane, to ochrona dzięki szczepieniom przed *long* COVID-19. Słabsza niż w stosunku do wcześniejszych wariantów ochrona przed infekcją omikron SARS-CoV-2 powoduje, że problem ten staje się coraz ważniejszy. Nie ma jasnej odpowiedzi na

pytanie, czy szczepienia chronią przed *long* COVID-19 [71]. Jeśli *long* COVID-19 jest poważnym zagrożeniem, to pojawi się pytanie, czy pomimo zakażenia się wszystkich wariantem omikron SARS-CoV-2 zaszczepieni są lepiej czy gorzej chronieni przed *long* COVID-19 w tym przypadku. Pierwsze optymistyczne dane sugerują, że szczepienie może zmniejszać szanse rozwoju *long* COVID-19 o około 50% u tych, którzy mimo szczepienia przechodzą infekcję [63].

OCENA SKUTECZNOŚCI SZCZEPIEŃ A DIAGNOSTYKA COVID-19

Ocena skuteczności szczepień jest nierozzerwalnie związana z diagnostyką. Ocena skuteczności szczepień musi się opierać na postawionej właściwie diagnozie. Jeśli więc ocenia się, czy szczepienia chronią przed infekcją lub chorobą, musi istnieć wiarygodna metoda oceny, u kogo rozpoznaje się określoną infekcję lub chorobę. W tym przypadku najczęściej zarzutów stawiano metodzie PCR, która jest wciąż udoskonalana. Specyficzność i czułość testów PCR jest oceniana bardzo wysoko [72, 73]. Jest to metoda stosowana od lat w diagnostyce m.in. chorób zakaźnych i onkologicznych [74, 75]. Nikt nie kwestionuje jej zastosowania np. w diagnostyce AIDS czy wirusowego zapalenia wątroby [76]. Jednym z najczęściej podnoszonych zarzutów było wykrywanie w PCR zneutralizowanych elementów wirionów, a nie wyłącznie wirionów zakaźnych, które są w stanie infekować kolejną osobę [77]. W obrębie próby odpowiedzi na pytanie, kto jest w stanie infekować, jest to zarzut sensowny [78]. Z tego też powodu skrócono czas kwarantanny. Zarzut ten nie ma natomiast większego znaczenia dla wykorzystania tego testu do odpowiedzi na pytanie, kto choruje, czy niedawno chorował na COVID-19 [79]. W dalszej części tekstu rozwinięto ten wątek. Występowanie remnantów wirionów u kogoś, kto nadal choruje, to istotny marker diagnostyczny. Choroba przechodzi w niebezpieczną fazę, gdy u większości chorych nie ma już wirionów mogących infekować kolejne osoby albo wiremia jest bardzo niska, ale wyniki testu PCR są nadal pozytywne [80]. Nie oznacza to jednak, że infekcja SARS-CoV-2 nie jest pierwotną przyczyną choroby. Związek przyczynowo-skutkowy między SARS-CoV-2 a COVID-19 dowiedziono nie tylko za pomocą badań korelacyjnych, lecz także za pomocą badań funkcjonalnych, wyjaśniając możliwie szybko to zjawisko w najważniejszych szczegółach [81–84]. Związku tego dowodzą także ostatnio wprowadzane terapie, które wycelowane są w białka właśnie tego wirusa [85]. Ostatecznie to również skuteczność szczepień lub przejścia infekcji świadczy o tym, że to SARS-CoV-2 jest przyczyną COVID-19. Zarzut o błędności metody PCR odwołujący się do wykrywania remnantów wirionowych nie ma sensu

w przypadku ustalania, kto w ogóle został zainfekowany, a kto nie, i jaka jest skuteczność szczepień. Nie ma również sensu, aby ten zarzut podnosić w celu stwierdzenia, w jakim zakresie szczepienia chronią przed chorobą lub zgonem. Warto zauważyć, że testy PCR i antygenowe wykrywają infekcję, jeśli dochodzi do niej wśród osób zaszczepionych. Paradoksalnie brak 100-procentowej skuteczności szczepień udowodniony przez te testy jest przyjmowany przez wszystkich, również krytyków testów PCR, za wiarygodny argument za niepełnym zakresem ochronnym szczepień.

Alternatywą pozwalającą wykryć infekcję SARS-CoV-2 są testy antygenowe (w tym przypadku przez testy diagnostyczne rozumie się takie jak ELISA, nie testy szybkie lub kasetkowe). Testy te charakteryzuje nieco mniejsza czułość zarówno analityczna, jak i diagnostyczna, natomiast ich swoistość diagnostyczna i specyficzność antygenowa jest bardzo wysoka [86]. W tym przypadku również nie ma gwarancji, że wykrywa się infekcyjne wiriony, a nie ich remnanty. Zdobycie takiej pewności wymaga co najmniej kilku dni kosztownych analiz w laboratorium BL3 (wysoka klasa bezpieczeństwa). Uniemożliwia to masowe prowadzenie tego typu badań i zagraża bezpieczeństwu wykonujących je osób oraz otoczeniu laboratorium – błąd w utylizacji materiału mógłby spowodować wybuch zachorowań wśród osób mających z nim styczność. Prowadzenie badań aktywności infekcyjnej wirionów na masową skalę jest nierealne ze względu na czas, przepustowość (a raczej jej brak), koszty i bezpieczeństwo.

Testy PCR oraz antygenowe były dodatkowo krytykowane za stosowanie ich jako jedynego kryterium choroby COVID-19. Problematyka diagnostyki chorób, takich jak COVID-19, jest złożona. Po pierwsze w ciągu kilku dni choroba przypominająca początkowo u niektórych grypę może przejść w zapalenie płuc zagrażające życiu [81]. Dodatkowo niektóre leki działają tylko w czasie pierwszych dni choroby, dopóki istnieją aktywne wiriony, a nie po kilkunastu dniach od infekcji, gdy pozostają rozpadłe wiriony. Do otrzymania wyniku nie może upłynąć kilka dni. Również wprowadzony ostatnio molnupirawir oraz rytanawir nie sprawdzą się po więcej niż 10 dniach od infekcji. Skuteczne terapie są celowane (przeciwko konkretnym molekułom charakterystycznym np. dla patogenu), dlatego ich zastosowanie wymaga rozpoznania molekularnego przyczyny choroby. Wykrywanie u niektórych pacjentów remnantów przez dłuższy czas dodatkowo utrudnia wskazanie dnia, w którym powinno się rozpocząć terapię.

Dla większości testów diagnostycznych 5–10% wyników fałszywych nie dyskredytuje ich [87]. W przypadku COVID-19 oczekiwano lepszej czułości i specyficzności, pomimo że od pobrania materiału do otrzymania wyniku miało upłynąć zaledwie kilkanaście godzin, a testy

miały być i są wykonywane nawet dla setek tysięcy osób w ciągu jednego dnia w kraju, takim jak Wielka Brytania. W konsekwencji nie było możliwości wykonania skomplikowanych analiz referencyjnych dla większości próbek, ale wykonano je dla ogólnej oceny metody. W pewnym okresie, kiedy chorobie częściej towarzyszyła utrata węchu, odstępowano od konieczności wykonania tych testów, aby postawić diagnozę, i dalej postuluje się możliwość rozpoznania COVID-19 pomimo negatywnych wyników testów PCR i antygenowych, jeśli objawy na to wyraźnie wskazują [88]. Postuluje się to tym bardziej, że wśród wyników fałszywych dominują fałszywie negatywne, czyli niewykrycie infekcji, mimo że ona obiektywnie istnieje. Oznacza to, że liczba przypadków COVID-19 jest niedoszacowana, a nie przeszacowana, co wykryto w badaniach na obecność przeciwciał [89, 90].

COVID-19 uświadamia, jak trudna jest diagnostyka, szczególnie gdy diagnoza musi być postawiona w ciągu godzin, a nie dni. Diagnostyka tej choroby jest więc wyzwaniem i odsłania dla szerszego ogółu problemy szybkiej diagnostyki w ogóle. Od kiedy ocenia się sensowność jej stosowania w przypadku szczepień, to – jak wspomniano – dzięki temu, że bardzo często wykrywa się infekcje wśród osób zaszczepionych, nastąpiła zgoda na powoływanie się na wyniki otrzymane za pomocą RT-PCR lub testy antygenowe nawet wśród osób, które je zdecydowanie kwestionowały. Tu przez testy antygenowe czy umożliwiające wykrywanie przeciwciał rozumie się testy ELISA, a nie kasetkowe. Testy kasetkowe (szybkie) od początku budziły duże wątpliwości i trudno je traktować jako *stricte* diagnostyczne [91]. Podobnie prawie nikt nie ma oporu, żeby akceptować paszporty covidowe na podstawie pozytywnego wyniku testu PCR, pomimo że mogą również zdarzać się wyniki fałszywie pozytywne, co może powodować u kilkuprocentowego odsetka osób zakwalifikowanych jako ozdrowieńcy nieuzasadnione poczucie ochrony. Uznano jednak najwyraźniej, że niewielki odsetek takich wyników nie stanowi takiego zagrożenia [90, 92–94]. Zarzuty przeciwko testom PCR i ELISA negujące całkowicie zasadność ich stosowania nie były naukowe i nie wypada się do nich odnosić. Sam zarzut wykrywania np. remnantów wirionowych taki nie był, niemniej nie daje to podstaw do odrzucenia tej metody jako skutecznego sposobu na wykrywanie aktualnej lub niedawno przebytej infekcji. Zjawisko to jest znane w przypadku chorób zakaźnych i określa się np. mianem *shedding* [95–97].

Można zauważyć również w wprowadzeniu szczepień pewną refleksję wśród osób, które bardzo swobodnie widziały w każdym zakażonym SARS-CoV-2 bezwzględnie chorego na COVID-19. Problem ten uświadomiło ponownie pojawienie się wariantu omikron SARS-CoV-2. W niektórych opracowaniach na temat chorób zakaźnych stosuje się rozróżnienie: mieć chorobę, a być cho-

rym. Chorobę może mieć osoba, która jest nosicielem w takim sensie, że może przekazać patogen, który wywoła objawy u kogoś innego. Niestety objawy po infekcji SARS-CoV-2 mogą również występować wiele miesięcy po jej przejściu. Ponownie widać wpływ psychologiczny na nomenklaturę. Osoby, które przeszły COVID-19 bez objawów, ale wykonane u nich testy PCR wskazały wynik pozytywny, nie mają z reguły nic przeciwko nazywaniu ich ozdrowieńcami, jakkolwiek skoro nie byli chorzy, to z czego ozdrowieli? A jeśli mają *long COVID-19*, to w jakim sensie są ozdrowieńcami?

Dodatkowo, podobnie jak w czasie szczepień zaobserwowano efekt *nocebo* [98], informowanie zainfekowanego, że jest chory może wpłynąć negatywnie na jego stan zdrowia i samopoczucie, co oczywiście nie oznacza, że spowoduje np. masywne zapalenie płuc [99]. Zjawisko to w przypadku szczepień opisano w artykule „Efekty niepożądane szczepień a potencjalne terapie przeciw COVID-19”. Problemy zarówno *nocebo*, jak i *placebo* są dyskutowane w medycynie od wielu lat, podobnie jak symulacja objawów [100]. Obiektywne badania diagnostyczne i markery biochemiczne miały zakończyć te dyskusje, ale nie zawsze jest to możliwe [101]. Sprawa ta ma dalszy ciąg w trakcie oceny *long COVID-19*. W tym przypadku cały obraz komplikuje się jeszcze bardziej [102]. Jedną z hipotez *long COVID-19* mówi o tym, że jest on związany z przetrwaniem w tkankach remnantów wirionów, które są wykrywane nawet po miesiącach od choroby [103]. Co bardziej intrygujące, pojawiają się nieliczne sugestie, że u niektórych pacjentów występują przetrwałe „mikroinfekcje” [104]. Opisano to np. w przypadku łożyska. Trzeba przyznać, że jest to struktura, co do której odpowiedź układu odpornościowego nie może być zbyt silna – występuje tu pewna immunotolerancja [105]. Podobnie immunotolerancja występuje również np. w ośrodkowym układzie nerwowym. Istnieje wiele przykładów wirusów, które mają taką możliwość. Wystarczy przypomnieć wirusa opryszczki [106]. Opisano również możliwość integracji DNA SARS-CoV-2 do genomu komórek ludzkich, pomimo że SARS-CoV-2 jest wirusem RNA, który nie ma odwrotnej transkryptazy [107]. Ma to również związek ze stosowaniem szczepień u ozdrowieńców z *long COVID-19*. Zagadnienie to jest ważne, ponieważ w tym przypadku byłyby to osoby, które są permanentnie immunizowane nawet przez remnanty lub bardziej aktywne wiriony obecne w śladowych ilościach. W związku z tym szczepienie takich osób ma niejednoznaczną rolę. Może mieć sens terapeutyczny, ale niekoniecznie profilaktyczny, szczególnie wśród osób młodszych. Ważne jest również pytanie, czy jeśli infekcja jest przetrwała, to czy te osoby infekują. Niestety nie ma wiarygodnych badań naukowych na temat wpływu szczepień u pacjentów z *long COVID-19*, są jedynie badania ankietowe, które trudno

traktować jako naukowe [108]. Badania mogą zmierzać w kierunku ustalenia, czy po szczepieniu osób z *long COVID-19* następuje poprawa czy pogorszenie. Jedną z prac sugeruje częstsze występowanie NOP-ów, ale ogólnie związane z przejściem COVID-19, a nie chorobami na *long COVID-19* [109].

W przypadku diagnostyki zmierzającej do ustalenia, kto przeszedł infekcję SARS-CoV-2, stosuje się metodę poszukiwania przeciwciał przeciwko białku SPIKE (tu ponownie odniesiono się do testów ELISA, a nie kasetkowych). Początkowo jako marker choroby próbowano stosować badania wykrywania przeciwciał klasy IgM przeciwko białku SPIKE. Była to jednak sytuacja wyjątkowa na początku pandemii, kiedy nie było jeszcze ozdrowieńców, a liczba laboratoriów wykonujących badania PCR była niewystarczająca. W tej chwili stosuje się te badania do wykrycia, kto przeszedł infekcję, ewentualnie jakie jest miano przeciwciał po zaszczepieniu.

W diagnostyce COVID-19 bardzo dużą rolę odegrało jednoczesne stosowanie metod PCR, testu antygenowego (białko N) i badań przeciwciał przeciwko białku SPIKE u ozdrowieńców, co pozwoliło potwierdzić skuteczność (czułość i swoistość), jak również spójność tych metod [110, 111].

Szczepienia za pomocą szczepionek, zarówno mRNA, jak i wektorowych, nie mogą powodować wyników fałszywie pozytywnych w testach PCR. Do tych testów wykorzystuje się bowiem nie tylko fragmenty genomu SARS-CoV-2 kodujące białko SPIKE tak jak w szczepionkach. Część produktów reakcji opiera się na innych fragmentach genomu wirusa niż otwarta ramka odczytu (*open reading frame* – ORF) dla białka SPIKE. Dodatkowo RNA ze szczepionek nie może, co do zasady, znaleźć się w żadnym materiale pobieranym do badania w stężeniu, które jest wykrywalne, nawet w testach PCR.

Po szczepieniu nie należy się również spodziewać pozytywnych wyników w testach antygenowych. Dla większości testów teoretycznie wykluczono taką możliwość, ponieważ w testach tych wykrywa się białko N (białko nukleokapsydu) wirusa SARS-CoV-2, a nie białko SPIKE [112]. Jeśli nawet wziąć pod uwagę nieliczne testy na SPIKE (do niedawna FDA dopuściła tylko jeden taki test), to stężenie SPIKE poza miejscem podania szczepionki jest bardzo niskie, więc znowu nie może być wykrywane. Czulość diagnostyczna i analityczna tych testów jest niższa niż PCR. Białko SPIKE (które wykrywa się tylko wyjątkowo w testach) jest praktycznie nieobecne, np. w wymazie z nosa po szczepieniu. Inaczej jest w trakcie infekcji – wtedy jest obecne w wielu organach. Możliwe, że nieliczne testy na obecność antygeny SPIKE nie będą mogły być stosowane u osób, które podda się szczepieniu szczepionką Novavax, ponieważ w tym przypadku stężenie antygeny może być wyższe.

Od kiedy wprowadzono szczepienia, bardzo trudno jest wykorzystać testy wykrywające przeciwciała do rozstrzygnięcia, kto przeszedł infekcję po szczepieniu, a kto tylko szczepienie [113]. Dzieje się tak, ponieważ pacjenci częściej wytwarzają przeciwciała przeciwko SPIKE (to białko jest najbardziej immunogenne), dlatego właśnie przeciwciała skierowane przeciw SPIKE wykrywa się zarówno u ozdowieńców, jak i u zaszczepionych. Bardzo rzadko próbuje się w tym celu wykorzystać możliwość wykrywania przeciwciał rozpoznających inne białko kapsydu SARS-CoV-2 niż SPIKE, a nawet białko N. Dzieje się tak, dlatego że przeciwciała te powstają rzadziej [12]. Wykrywanie tych przeciwciał może prowadzić do wyników fałszywie negatywnych, gdyby chciał je stosować w celu ustalenia, kto przeszedł COVID-19. Wykrywanie ich dawałoby jednak pewną szansę na stwierdzenie, kto przeszedł infekcję po szczepieniu. W tej sytuacji po wprowadzeniu szczepień, jeśli nie wykona się w odpowiednim momencie badania techniką RT-PCR, nie ma możliwości stwierdzenia, czy ktoś po szczepieniu przeszedł infekcję SARS-CoV-2, bo zarówno zaszczepiony, jak i ozdowieńca ma przeciwciała przeciwko SPIKE. Wydaje się, że jest to jednak pewnego rodzaju mankament, ale nie ma możliwości jego wykluczenia, ponieważ SPIKE jest najbardziej immunogenne i dlatego wytypowano go do szczepień. Jego największa immunogenność powoduje jednocześnie, że ozdowieńcy mają najwięcej przeciwciał przeciwko temu białku.

Pomimo różnych ograniczeń metody analityczne stosowane w diagnostyce COVID-19 pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących efektów działania szczepień. Dodatkowe informacje na temat diagnostyki COVID-19 poruszono w artykule „Efekty niepożądane szczepień a potencjalne terapie przeciw COVID-19”.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy są członkami międzynarodowego zespołu opracowującego terapię przeciw COVID-19. Terapia ta nie została opisana w artykule.

PIŚMIENNICTWO

- Chmielewska AM, Czarnota A, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. Immune response against SARS-CoV-2 variants: the role of neutralization assays. *npj Vaccines* 2021; 6: 142.
- Cromer D, Steain M, Reynaldi A, et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe* 2022; 3: e52-61.
- Cao Y, Wang J, Jian F, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-021-04385-3.

- Carreño JM, Alshammary H, Tcheou J, et al. Activity of convalescent and vaccine serum against SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-022-04399-5.
- Cameron E, Bowen JE, Rosen LE, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-021-04386-2.
- Planas D, Saunders N, Maes P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-021-04389-z.
- Sariol CAA, Pantoja P, Serrano-Collazo C, et al. Function is more reliable than quantity to follow up the humoral response to the receptor-binding domain of SARS-CoV-2-Spike protein after natural infection or COVID-19 vaccination. *Viruses* 2021; 13: 1972.
- Ramírez Hernández E, Hernández-Zimbrón LF, Martínez Zúñiga N, et al. The role of the SARS-CoV-2 S-protein glycosylation in the interaction of SARS-CoV-2/ACE2 and immunological responses. *Viral Immunol* 2021; 34: 165-73.
- Coronavirus “a wolf in sheep’s clothing”, tricking its way into the human body. *BBC Science Focus Magazine*. <https://www.sciencefocus.com/news/coronavirus-a-wolf-in-sheeps-clothing-tricking-its-way-into-the-human-body/>
- Huang HC, Lai YJ, Liao CC, et al. Targeting conserved N-glycosylation blocks SARS-CoV-2 variant infection in vitro. *EBioMedicine* 2021; 74: 103712.
- Zhao H, Lu L, Peng Z, et al. SARS-CoV-2 omicron variant shows less efficient replication and fusion activity when compared with delta variant in TMPRSS2-expressed cells. *Emerg Microbes Infect* 2022; 11: 277-83.
- Jörrißen P, Schütz P, Weiand M, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 membrane protein in patients of the acute and convalescent phase of COVID-19. *Front Immunol* 2021; 12: 679841.
- Woldemeskel BA, Garliss CC, Blankson JN. mRNA vaccine-elicited SARS-CoV-2-specific T cells persist at 6 months and recognize the delta variant. *Clin Infect Dis* 2021; ciab915. doi:10.1093/cid/ciab915.
- Neidleman J, Luo X, McGregor M, et al. mRNA vaccine-induced T cells respond identically to SARS-CoV-2 variants of concern but differ in longevity and homing properties depending on prior infection status. *eLife* 2021; 10: e72619.
- Niessl J, Sekine T, Buggert M. T cell immunity to SARS-CoV-2. *Semin Immunol* 2021; 55: 101505.
- Angyal A, Longet S, Moore SC, et al. T-cell and antibody responses to first BNT162b2 vaccine dose in previously infected and SARS-CoV-2-naïve UK health-care workers: a multicentre prospective cohort study. *Lancet Microbe* 2022; 3: e21-31.
- Swadling L, Maini MK. T cells in COVID-19 – united in diversity. *Nature Immunol* 2020; 21: 1307-8.
- Turner JS, O’Halloran JA, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-021-03738-2.
- Shaan Lakshmanappa Y, Elizaldi SR, Roh JW, et al. SARS-CoV-2 induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. *Nature Commun* 2021; 12: 541.
- Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nature Microbiol* 2020; 5: 1185-91.
- Luo F, Liao FL, Wang H, et al. Evaluation of antibody-dependent enhancement of SARS-CoV infection in rhesus macaques immunized with an inactivated SARS-CoV vaccine. *Virol Sinica* 2018; 33: 201-4.

22. Qin E, Shi H, Tang L, et al. Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 1028-34.
23. Zhou R, Wang P, Wong YC, et al. Nasal prevention of SARS-CoV-2 infection by intranasal influenza-based boost vaccination in mouse models. *EBioMedicine* 2022; 75. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103762.
24. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature* 2021; 595: 421-5.
25. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med* 2020; 8: e70.
26. Tartof SY, Slezak JM, Fischer H, et al. Effectiveness of mRNA BNT162b2 COVID-19 vaccine up to 6 months in a large integrated health system in the USA: a retrospective cohort study. *Lancet* 2021; 398: 1407-16.
27. Olliaro P, Torreele E, Vaillant M. COVID-19 vaccine efficacy and effectiveness – the elephant (not) in the room. *Lancet Microbe* 2021; 2: e279-80.
28. Scobie HM, Johnson AG, Suthar AB, et al. Monitoring incidence of COVID-19 cases, hospitalizations, and deaths, by vaccination status – 13 U.S. Jurisdictions, April 4–July 17, 2021. *MMWR Morbidity Mortality Weekly Report* 2021; 70. doi:10.15585/mmwr.mm7037e1.
29. State W. COVID-19 Cases, Hospitalizations, and Deaths by Vaccination Status.; 2022. https://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/1600/coronavirus/data-tables/421-010-CasesInNotFullyVaccinated.pdf?fbclid=IwAR0d0TtCK2m7AJh6_Pr69zN2PJQ85PSiV5rLrYKVfB-6xgfVUv3ZEsqBLU
30. Bahl A, Johnson S, Maine G, et al. Vaccination reduces need for emergency care in breakthrough COVID-19 infections: a multicenter cohort study. *Lancet Regional Health Am* 2021; 4: 100065.
31. Meslé MM, Brown J, Mook P, et al. Estimated number of deaths directly averted in people 60 years and older as a result of COVID-19 vaccination in the WHO European Region, December 2020 to November 2021. *Eurosurveillance* 2021; 26: 2101021.
32. Countries. www.euro.who.int. <https://www.euro.who.int/en/countries>
33. Cohn BA, Cirillo PM, Murphy CC, et al. SARS-CoV-2 vaccine protection and deaths among US veterans during 2021. *Science* 2021; 375: 331-6.
34. COVID-19 Switzerland. www.covid19.admin.ch. Accessed January 18, 2022. <https://www.covid19.admin.ch/en/vaccination/status?devViewTotal=areas&vaccStatusDevRel=inz100>
35. Hepatitis A and Hepatitis B Vaccines: Be Sure Your Patients Get the Correct Dose. <https://www.immunize.org/catg.d/p2081.pdf>
36. 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. 2022. doi:10.1101/2021.12.28.21268481.
37. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2603-15.
38. KY SK, Bhat PKR, Sorake CJ. Double trouble: a pandemic of obesity and COVID-19. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2021; 6: 608.
39. Mundi MS, Patel JJ, Mohamed Elfadil O, et al. When pandemics collide: the interplay of obesity and COVID-19. *Curr Gastroenterol Rep* 2021; 23: 26.
40. Centers for Disease Control and Prevention. People with certain medical conditions. Centers for Disease Control and Prevention. 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>
41. Butsch WS, Hajduk A, Cardel MI, et al. COVID-19 vaccines are effective in people with obesity: a position statement from The Obesity Society. *Obesity* 2021; 29: 1575-9.
42. Collie S, Champion J, Moultrie H, et al. Effectiveness of BNT162b2 vaccine against omicron variant in South Africa. *N Engl J Med* 2022; 386: 494-6.
43. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Universal coronavirus vaccines – an urgent need. *N Engl J Med* 2022; 386: 297-9.
44. Cross-reactive adaptive immunity against coronaviruses in young children. *Nature Immunol* 2022; 23: 11-2.
45. Zedan HT, Nasrallah GK. Is preexisting immunity to seasonal coronaviruses limited to cross-reactivity with SARS-CoV-2? A seroprevalence cross-sectional study in north-eastern France. *EBioMedicine* 2021; 71: 103580.
46. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 2020; 181: 1489-501.
47. Gazit S, Shlezinger R, Perez G, et al. Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections. *medRxiv* 2021. doi:10.1101/2021.08.24.21262415.
48. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* 2021; 595: 426-31.
49. Shenai MB, Rahme R, Noorchashm H. Equivalency of protection from natural immunity in COVID-19 recovered versus fully vaccinated persons: a systematic review and pooled analysis. *Cureus* 2021; 13: e19102.
50. Kojima N, Klausner JD. Protective immunity after recovery from SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis* 2022; 22: 12-4.
51. Wang Z, Yang X, Zhong J, et al. Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nature Commun* 2021; 12: 1724.
52. Wei J, Matthews PC, Stoesser N, et al. Anti-spike antibody response to natural SARS-CoV-2 infection in the general population. *Nature Commun* 2021; 12: 6250.
53. Historical Reinfection Data. 2020. Accessed January 18, 2022. <https://covid19.ncdhhs.gov/media/3500/download?attachment>
54. Deaths involving COVID-19 by vaccination status, England – Office for National Statistics. www.ons.gov.uk. 2021. <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/articles/deathsinvolvingcovid19byvaccinationstatusengland/deathsoccurringbetween2januaryand2july2021>
55. Kaplan J. Newly obtained data shows 94% COVID deaths in NC are unvaccinated. ABC11 Raleigh-Durham. Published July 30, 2021. Accessed January 18, 2022. <https://abc11.com/coronavirus-nc-covid-19-death-delta-variant/10919954/>
56. Poon MML, Rybkina K, Kato Y, et al. SARS-CoV-2 infection generates tissue-localized immunological memory in humans. *Science Immunol* 2021; 6: eabl9105.
57. Scientists debate potential benefits of intranasal COVID-19 vaccines. PBS NewsHour. 2021. Accessed January 18, 2022. <https://www.pbs.org/newshour/health/scientists-debate-potential-benefits-of-intranasal-covid-19-vaccines>
58. Reyes RA, Clarke K, Gonzales SJ, et al. SARS-CoV-2 spike-specific memory B cells express higher levels of T-bet and FcRL5 after non-severe COVID-19 as compared to severe disease. *PLoS One* 2021; 16: e0261656.

59. Wheatley AK, Juno JA, Wang JJ, et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. *Nature Commun* 2021; 12: 1162.
60. Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Bertollini R. Severity of SARS-CoV-2 reinfections as compared with primary infections. *N Engl J Med* 2021; 385: 2487-9.
61. Krause P, Fleming T, Peto R, et al. Viewpoint considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *Lancet* 2021; 398: 1377-80.
62. Kent SJ, Juno JA. Vaccination after prior COVID-19 infection: implications for dose sparing and booster shots. *EBioMedicine* 2021; 72: 103586.
63. Antonelli M, Penfold RS, Merino J, et al. Risk factors and disease profile of post-vaccination SARS-CoV-2 infection in UK users of the COVID Symptom Study app: a prospective, community-based, nested, case-control study. *Lancet Infect Dis* 2021; 22: 43-55.
64. Gomes LC, Sanson MCG, Brainin P, et al. Levels of hepatitis B antibody titers are affected by age and doses gap time in children from a high endemic area of the western Amazon. *PLoS One* 2021; 16: e0253752.
65. Cavanaugh AM, Spicer KB, Thoroughman D, et al. Reduced risk of reinfection with SARS-CoV-2 after COVID-19 vaccination – Kentucky, May–June 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; 70: 1081-3.
66. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest* 2013; 123: 958-65.
67. Singanayagam A, Hakki S, Dunning J, et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis* 2022; 22: 183-95.
68. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in Israel. *N Engl J Med* 2021; 385: e85.
69. Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, et al. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study. *Lancet* 2021; 397: 1204-12.
70. Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, et al. Reinfection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in patients undergoing serial laboratory testing. *Clin Infect Dis* 2022; 74: 294-300.
71. Ledford H. Do vaccines protect against long COVID? What the data say. *Nature* 2021; 599: 546-8.
72. Healy B, Khan A, Metezai H, et al. The impact of false positive COVID-19 results in an area of low prevalence. *Clin Med* 2021; 21: e54-6.
73. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nature Commun* 2020; 11: 4812.
74. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 337-48.
75. Sokolenko AP, Imyanitov EN. Molecular diagnostics in clinical oncology. *Front Mol Biosci* 2018; 5: 76.
76. Fearon M. The laboratory diagnosis of HIV infections. *Canad J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 26-30.
77. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581: 465-9.
78. Binnicker MJ. Can testing predict SARS-CoV-2 infectivity? The potential for certain methods to be a surrogate for replication-competent virus. *J Clin Microbiol* 2021; 59: e0046921.
79. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, et al. Assessment of SARS-CoV-2 RNA test results among patients who recovered from COVID-19 with prior negative results. *JAMA Intern Med* 2021; 181: 702-4.
80. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or moderate Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383: 1757-66.
81. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, et al. Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. *Nature* 2020; 591: 92-8.
82. Heyman SN, Kinaneh S, Abassi Z. The duplicitous nature of ACE2 in COVID-19 disease. *EBioMedicine* 2021; 67: 103356.
83. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol* 2020; 41: 1100-45.
84. Li X, Geng M, Peng Y, et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Analysis* 2020; 10: 102-8.
85. Fan H, Lou F, Fan J, et al. The emergence of powerful oral anti-COVID-19 drugs in the post-vaccine era. *Lancet Microbe* 2022; 3: e91.
86. Karon BS, Donato L, Bridgeman AR, et al. Analytical sensitivity and specificity of four point of care rapid antigen diagnostic tests for SARS-CoV-2 using real-time quantitative PCR, quantitative droplet digital PCR, and a mass spectrometric antigen assay as comparator methods. *Clin Chem* 2021; 67: 1545-53.
87. Shreffler J, Huecker MR. Diagnostic Testing Accuracy: Sensitivity, Specificity, Predictive Values and Likelihood Ratios. *StatPearls* 2020.
88. Lekpa FK, Njonou SRS, Balti E, et al. Negative antigen RDT and RT-PCR results do not rule out COVID-19 if clinical suspicion is strong. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 1209.
89. Zhang Z, Bi Q, Fang S, et al. Insight into the practical performance of RT-PCR testing for SARS-CoV-2 using serological data: a cohort study. *Lancet Microbe* 2021; 2: e79-87.
90. Surkova E, Nikolayevskyy V, Drobniewski F. False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 1167-8.
91. Health C for D and R. Potential for False Positive Results with Antigen Tests for Rapid Detection of SARS-CoV-2 – Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care Providers. FDA. 2020. <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/potential-false-positive-results-antigen-tests-rapid-detection-sars-cov-2-letter-clinical-laboratory>
92. Layfield LJ, Camp S, Bowers K, Miller DC. SARS-CoV-2 detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction testing: analysis of false positive results and recommendations for quality control measures. *Pathol Res Practice* 2021; 225: 153579.
93. Patriquin G, Davidson RJ, Hatchette TF, et al. Generation of false-positive SARS-CoV-2 antigen results with testing conditions outside manufacturer recommendations: a scientific approach to pandemic misinformation. *Microbiol Spectrum* 2021; 9: e0068321.
94. Fearon E, Buchan IE, Das R, et al. SARS-CoV-2 antigen testing: weighing the false positives against the costs of failing to control transmission. *Lancet Respir Med* 2021; 9: 685-7.
95. Phillips SP, Wei X, Kwong JC, et al. Duration of SARS-CoV-2 shedding: a population-based, Canadian study. *PLoS One* 2021; 16: e0252217.
96. Agarwal V, Venkatakrishnan AJ, Puranik A, et al. Long-term SARS-CoV-2 RNA shedding and its temporal association to IgG seropositivity. *Cell Death Discov* 2020; 6: 138.

97. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, et al. Assessment of SARS-CoV-2 RNA test results among patients who recovered from COVID-19 with prior negative results. *JAMA Intern Med* 2021; 181: 702-4.
98. Sever PP. Nocebo affects after COVID-19 vaccination. *Lancet Reg Health Eur* 2022; 12: 100273.
99. Daniali H, Flaten MA. Experiencing COVID-19 symptoms without the disease: the role of nocebo in reporting of symptoms. *Scand J Public Health* 2021;140349482110183. doi:10.1177/14034948211018385
100. Evers AWM, Colloca L, Blease C, et al. Implications of placebo and nocebo effects for clinical practice: expert consensus. *Psychother Psychosom* 2018; 87: 204-10.
101. Siguan A. Conspiracies and the nocebo effect during the COVID-19 pandemic. *J Public Health* 2021; fdab327. doi: 10.1093/pubmed/fdab327.
102. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 2021; 27: 601-15.
103. Marx V. Scientists set out to connect the dots on long COVID. *Nature Methods* 2021; 18: 449-53.
104. Wu H, Liao S, Wang Y, et al. Molecular evidence suggesting the persistence of residual SARS-CoV-2 and immune responses in the placentas of pregnant patients recovered from COVID-19. *Cell Prolif* 2021; 54: e13091.
105. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 121-7.
106. Field HJ. Persistent herpes simplex virus infection and mechanisms of virus drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 671-80.
107. Zhang L, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118: e2105968118.
108. Long Covid symptoms ease after vaccination, survey finds. *the Guardian*. 2021. Accessed January 18, 2022. <https://www.theguardian.com/society/2021/may/18/long-covid-symptoms-ease-after-vaccination-survey-finds>
109. Raw RK, Kelly CA, Rees J, et al. Previous COVID-19 infection, but not Long-COVID, is associated with increased adverse events following BNT162b2/Pfizer vaccination. *J Infect* 2021; 83: 381-412.
110. Allan-Blitz LT, Klausner JD. A real-world comparison of SARS-CoV-2 rapid antigen testing versus PCR testing in Florida. *J Clin Microbiol* 2021; 59: e0110721.
111. CDC. Information for Laboratories about Coronavirus (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention. 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
112. Barlev-Gross M, Weiss S, Ben-Shmuel A, et al. Spike vs nucleocapsid SARS-CoV-2 antigen detection: application in nasopharyngeal swab specimens. *Anal Bioanal Chem* 2021; 413: 3501-10.
113. 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. doi:10.1038/s41564-021-00947-3