

# Možnosti péče o jedince postižené infekcí SARS-CoV-2

Lochman I.<sup>1,2</sup>, Thon V.<sup>2,3,4</sup>, Kratochvíla J.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Spadia Lab, Ostrava

<sup>2</sup> Ústav laboratorní medicíny lékařské fakulty OU, Ostrava

<sup>3</sup> RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

<sup>4</sup> AKIMED, Brno

<sup>5</sup> SEKK, Pardubice

## SOUHRN

V tomto příspěvku by se autoři rádi podělili o své zkušenosti v laboratorní diagnostice a v péči o jedince postižené infekcí SARS-CoV-2 a ve včasných stádiích onemocnění COVID-19, které tato infekce může vyvolávat. Vycházejí při tom z výsledků testů, které byly prováděny v laboratořích Spadia Lab Ostrava při postupném zavádění a interní verifikaci laboratorních metod v diagnostice této infekce do rutinní praxe, ze zkušeností s péčí o takovéto jedince v ambulanci AKIMED Brno a poznatků získaných z jim dostupné literatury k této problematice. K diskusi jsou předloženy názory autorů na současný stav v laboratorní diagnostice této infekce a jí vyvolaného onemocnění a možnosti zefektivnění péče o osoby postižené touto infekcí a onemocněním především v jejich časných stádiích, i když jsou si vědomi, že jejich soubor osob, na kterých byla data pro studii získána, je malý a limitující.

**Klíčová slova:** Infekce SARS-CoV-2, laboratorní diagnostika, COVID-19, humorální a buněčná imunita.

## SUMMARY

### Lochman I., Thon V., Kratochvíla J.: Care options for individuals affected by SARS-CoV-2 infection

In this work, the authors would like to share their experience in laboratory diagnostics and in the care of individuals affected by SARS-CoV-2 infection and in the early stages of the disease of COVID-19 that this infection can cause. It is based on the results of tests that were carried out in the laboratories of Spadia Lab Ostrava during the gradual introduction and internal verification of laboratory methods in the diagnosis of this infection into routine practice, on the experience of caring for such individuals in the AKIMED Brno outpatient clinic and the knowledge obtained with them from the available literature on this issue. The author's opinions on the current state of laboratory diagnosis of this infection and the disease caused by it and the possibility of streamlining the care of people affected by this infection and the disease, especially in their early stages, are presented for discussion, even though they are aware that their set of people on whom the data was for the study obtained is small and limiting. The full English version of the article is available here [1].

**Keywords:** SARS-CoV-2 infection, laboratory diagnostics, COVID-19, humoral and cellular immunity.

## Úvod

Onemocnění pojmenované WHO 11. 2. 2020 jako COVID-19 vyvolané do prosince 2019 neznámým virem bylo poprvé popsáno v čínském Wu-chanu. Záhy bylo zjištěno, že je vyvolává dosud neznámý coronavirus označený později jako SARS-CoV-2. Brzy se tento virus rozšířil po celém světě a způsobil pandemii, ve které mu podle WHO k 13. 12. 2022 více než 6,6 miliónu lidí z více než 645 miliónu pozitivně testovaných jedinců. Počet infikovaných osob se vyskytoval ve vlnách, kdy nejvyšší vlna byla celosvětově zaznamenána od ledna do března roku 2022. Podle výskytu v jednotlivých oblastech světa se usuzuje, že COVID-19 může mít sezónní charakter. Morbidita a mortalita viru je prokazatelně ovlivněna postupnou promořeností populace tímto virem a vakcinací proti němu, které umožňují lidské populaci se na tento virus adaptovat. Vakcinace je zatím založena v drtivé většině na vakcínách vyvolávajících buněčnou a protilátkovou odpověď proti hroto-

vým (spike) antigenům viru, které jsou klíčové pro zachycení viru především na sliznicích respiračního traktu infikovaného jedince a při jeho průniku dovnitř postiženého organismu člověka. Mezi dosud aplikovanými vakcínami se největší naděje vkládaly do RNA vakcín kvůli možnosti jejich technologicky relativně jednoduché úpravy specifické pro jednotlivé nově vznikající varianty viru. Bohužel se ukázalo, že virus mutuje a vytváří infekčně významné varianty, z nichž nová prakticky vytlačí variantu stávající tak rychle, že přizpůsobování vakcín aktuálním variantám viru vyvolávajícím u vnímavých jedinců COVID-19 nebylo v praxi realizováno. Naštěstí se ukazuje, že poslední varianta SARS-CoV-2 (B.1.1.529) nazvaná omikron, která byla identifikována poprvé na začátku listopadu 2021 i její subvarianty nevyvolávají u většiny osob infikovaných touto variantou viru tak závažné zdravotní potíže jako některé varianty předešlé. Ukázalo se také, že i stávající dostupné vakcíny dokážou očkované jedince chránit proti novým variantám viru tak, že jedinec napadený SARS-CoV-2 prodělá

většinou infekci těmito variantami bezpříznakově nebo jen s mírnými příznaky [2, 3]. Co by bylo podle našeho názoru zapotřebí zlepšit, je zrychlení diagnostiky této infekce u jedinců s jejich příznaky a v jejich časných stádiích a u onemocnění COVID-19, které může vyvolávat. Vycházíme při tom ze zkušeností získaných v ambulanci AKIMED Brno.

Poněvadž SARS-CoV-2 je respirační virus, laboratorní diagnostika jeho infekce je založena na průkazu specifických úseků virové RNA z hrotové oblasti viru pomocí RT-PCR testu, popř. průkazu specifických antigenů z této oblasti, ve stěrech z nosohltanu. V pozdějších stádiích infekce, kdy již virus nemusí být na sliznicích nosohltanu přítomen, ale postižený jedinec trpí příznaky COVID-19, může pomoci k odhalení nebo potvrzení původce zdravotních potíží stanovení protilátek v séru nebo vyšetření buněčné imunity proti SARS-CoV-2 antigenům z krve. Dostupné jsou dnes již i testy, stanovující v krvi, séru nebo plasmě nukleokapsidové antigeny viru. Při vývoji testovacích souprav pro tato vyšetření nemohla být zpočátku dodržena pravidla pro jejich řádnou validaci a verifikaci jak výrobci, tak i laboratořemi. Tato pravidla daná příslušnými normami nejsou, bohužel, v praxi aplikována v laboratořích většinou dodnes, i když by to bylo často díky nashromážděným datům již možné [4]. Počítá s tím i připravovaná norma ISO 17849:2023 „Validation and verification of quantitative and qualitative methods in medical laboratories“. Nerespektování těchto pravidel vede k tomu, že různé aplikované metody nemusí poskytovat pro stejně nazývané analyty a parametry shodné výsledky a aplikované metody nejsou zatím vzájemně harmonizovány. Výsledky jednotlivých laboratoří aplikujících diagnostiku různých výrobců jsou pak pro kliniky, kteří obdrží výsledky z různých laboratoří, často nesrovnatelné. Laboratoře Spadia Lab Ostrava měly možnost v rámci interní verifikace nových testů dostupných a zaváděných pro diagnostiku SARS-CoV-2 infekce a COVID-19 srovnat několik takovýchto testů. Výsledky těchto srovnání a jejich možného dopadu pro diagnostiku SARS-CoV-2 infekce a léčbu COVID-19 jsou také předmětem této práce.

## Materiál a metody

Kromě výsledků vyšetření anonymních vzorků jsou do této práce zařazeny především výsledky studie, do níž bylo zařazeno 24 zdravotnických pracovníků. Studie měla původně za cíl srovnat dva IGRA (Interferon Gamma Release Assay) určené pro diagnostiku SARS-CoV-2 infekce ve třech bězích realizovaných v březnu 2021, červenci 2021 a na přelomu roku 2021 a 2022. Nakonec však byla rozšířena o další testy z oblasti humorální imunity, které jsme měli možnost v tomto období provádět. Podrobná charakteristika těchto jedinců je uvedena v Tabulce 1 přílohy a jejím komentáři. Ode všech těchto jedinců byl získán informovaný souhlas s účastí v této studii. Většina z nich prodělala před zařazením do studie nebo během ní COVID-19, jehož symptomy a průběh byly hodnoceny podle Tabulky 2 přílohy.

Všechna laboratorní vyšetření byla prováděna podle pokynů výrobců v uživatelských manuálech k jednotlivým používaným testovacím soupravám. IGRA testy byly prováděny soupravami firem Euroimmun a Qiagen. Kultivace probíhala vždy 24 hod., supernatanty kultur stažené po této kultivaci byly zamrazeny a skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do stanovení IFN $\gamma$  pomocí ELISA testů těchto dvou výrobců. Alikvoty těchto vzorků byly dále skladovány při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U všech jedinců ve studii byl stanoven také počet leukocytů a jejich diferenciální rozpočet na analyzátoru Sysmex XN 2000 a anti-SARS-CoV-2 protilátky ve třídě IgG, IgA (v březnovém běhu i IgM) proti hrotovým a nukleokapsidovým antigenům testy firem Euroimmun a DiaSorin. Celkové protilátky proti SARS-CoV-2 byly stanoveny u několika jedinců také soupravou firmy Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 na analyzátoru Cobas e 602. U jedinců, kteří byli vyšetřeni v prvním běhu studie byl stanoven také nukleokapsidový antigen v séru soupravou firmy Biohit SARS-CoV-2 Quantitative Test Kit, CRP soupravou firmy Roche CRP L3 kit, IL-6 soupravou Immulite 2000/xPi IL-6 kit a IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, leptin a adiponektin soupravou hLuminex Magnetic Assay (6 Plex) firmy R&D dodanou firmou Bio-Techne na přístroji Luminex 200. Ze zamražených vzorků sér bylo dodatečně provedeno i stanovení neutralizačních protilátek soupravou SARS-CoV-2 NeutralISA a panelu sedmi anti-HCoV protilátek souprava Euroline anti-SARS-CoV-2 Profile (IgG) firmy Euroimmun. Stanovování lidského IgG proti SARS-CoV-2 antigenům S1, S2 a NP je CE certifikováno. Stanovování lidského IgG proti HCoV-HKU-1-NP, HCoV-OC43-NP, HCoV-NL63-NP a HCoV-229E-NP má u této soupravy jen informační záměr.

Při srovnávání výsledků získaných různými metodami se osvědčuje vyjadřovat tyto výsledky v indexech positivity (IP), což je poměr naměřené hodnoty vzorku k hodnotě klinické rozhodovací meze (cut-off) testu. IP tak vyjadřuje nezávisle na jednotkách jednotlivých testů, jak silně je analyzovaný vzorek pozitivní nebo negativní. Přispívá tak nejen k částečné harmonizaci výsledků různých testů stanovujících daný analyt, ale i různých běhů téhož testu. Na druhé straně je velmi jednoduché přepočítat IP na jednotky udávané výrobcem testu, jímž byl analyt stanovován. Proto IP využíváme také v naší studii.

Statistická vyhodnocení byla prováděna pomocí nástrojů tabulkového procesoru Excel a statistických software Stata V7 a Social Science Statistics dostupného na <https://www.socscistatistics.com/>.

## Výsledky

Aby byl článek přehlednější, jsou všechny tabulky a obrázky, na něž se v článku odkazujeme, uloženy v příloze [5].

Cílem studie bylo původně jen srovnání a verifikace IGRA testů firem Euroimmun a Qiagen, z nichž jeden z nich jsme chtěli zavést do rutinní diagnostiky. Výsledky tohoto srovnání jsou zobrazeny v obr. 1A přílohy. Vyplyvá z něj, že pozitivní odpověď na SARS-CoV-2 antigeny je častější u IGRA-1 (Quant-T-Cell SARS-CoV-2)

testu firmy Euroimmun než u IGRA firmy Qiagen (QFN SARS-CoV-2). Tyto výsledky byly prezentovány také na ESCV kongresu v Manchesteru [6]. Může být způsobena řadou faktorů, které jsou uvedeny v diskusi.

Srovnání testů uvedené v naší studii a na obr. 1A až 1F přílohy se zabývá jen analytickým srovnáváním testů. U jejich výsledků není bráno v úvahu za jak dlouho po událostech, které proběhly, tj. po ukončené vakcinaci nebo po prodělaném onemocnění COVID-19, bylo vyšetření provedeno a jaký měla tato událost průběh. To vše je velmi důležité znát pro správnou interpretaci výsledků měření. Ukazuje to obr. 1C přílohy. Je z něj zřejmé, že variabilita individuální reaktivity na SARS-CoV-2 infekci nebo vakcinaci proti tomuto viru se u vyšetřených jedinců velmi liší. Reaktivita se udržuje různě dlouho a výsledky provedených vyšetření musí proto být posuzovány a hodnoceny individuálně, vždy v kontextu s anamnézou hodnoceného jedince.

Ukázalo se, že vzájemná korelace mezi srovnávanými buněčnými a protilátkovými testy je poměrně dobrá a statisticky významná (viz Tabulka 3 přílohy). Absolutní hodnoty naměřené u konkrétních jedinců je však nutné vyhodnocovat individuálně se znalostí anamnézy (viz obr.1 přílohy).

Stanovení IgG protilátek proti nukleokapsidovému antigenu bylo podle očekávání u většiny očkovaných jedinců zařazených do studie negativní. Slabé nebo mezní (neprůkazné) pozitivita byly naměřeny testem Anti-SARS-CoV-2 NCP IgG ELISA firmy Euroimmun jen u několika jedinců, kteří byli vyšetřeni brzy po odeznění COVID-19 s alespoň středně těžkým průběhem. Rovněž pozitivní koncentrace nukleokapsidového antigenu v séru nebyla naměřena v březnovém běhu u žádného jedince zařazeného do studie, vyjma hospitalizovaných jedinců s těžkým průběhem COVID-19, kteří však do studie nebyli zařazeni.

Neutralizační protilátky stanovené testem SARS-CoV-2 NeutralISA v koncentracích >35 IH byly naměřeny prakticky u všech jedinců, kteří měli, byť i jen nízké, pozitivní koncentrace IgG protilátek proti hrotovým antigenům SARS-CoV-2 (obr. 1E přílohy).

Stanovení protilátek soupravami různých výrobců se může významně lišit a harmonizace používaných testů je proto naprosto nezbytná. Dokládá to i obr. 1F přílohy.

V mezích referenčních intervalů byly u našeho souboru 24 jedinců také stanovené sérové koncentrace CRP a IL-6, což nebylo překvapivé, neboť vyšetřování byli jedinci, kteří se v době odběru krve cítili zdraví.

Zajímavé bylo zjištění, že u 20 z 24 jedinců zařazených do studie byly soupravou Euroline anti-SARS-CoV-2 Profile (IgG) prokázány protilátky proti jednomu nebo několika nukleokapsidovým (NC) antigenům lidských koronaviřů (hCoV), které dnes nezpůsobují závažné respirační infekce a protilátky proti nim se běžně nevyšetřují. Jedná se o viry HKU1, OC43, NL63 a 229E. V rámci studie byli všichni jedinci tímto testem vyšetřeni 2 až 4krát. Jasná pozitivita protilátek (IP 2 – ≥5) alespoň proti jednomu z těchto čtyř virů byla prokázána u 20 z 24 (83 %) do studie zařazených jedinců. Lze tedy předpokládat, že značná část populace je před setkáním se SARS-CoV-2 preimunizována některým z těchto virů [7]. Za pozornost stojí také to, že hCoV OC43 bývá

také označován jako původce tzv. ruské chřipky, která v letech 1889-1892 zapříčinila úmrtí zhruba 1 miliónu z celosvětového počtu 1,5 miliardy lidí [8]. Panel soupravy dovoluje stanovit zároveň také protilátky proti S1 hrotovému, S2 hrotovému a NC antigenům SARS-CoV-2. Jasná pozitivita protilátek (IP 2 – ≥5) byla prokázána alespoň jednou proti S1 antigenům u 19 (79 %), S2 antigenům u 18 (75 %) a NC antigenům u 10 (42 %) jedinců. Přestože korelace výsledků získaných klasickými ELISA testy na stanovení IgG protilátek proti hrotovému a nukleokapsidovým antigenům SARS-CoV-2 a blotovou technikou je dobrá, porovnávání absolutních hodnot výsledků získaných oběma technikami vyžaduje nutně harmonizaci (obr. 2A-D přílohy).

V průběhu studie bylo prováděno v rámci zavádění nových testů v diagnostice infekce SARS-CoV-2 a průběhu onemocnění COVID-19 v laboratořích Spadia Lab i testování dalších souprav, které ale nebylo zařazeno do studie, většinou pro malý počet testovaných vzorků. Ukázalo se, že u jedinců, kteří byli v době odběru krve pod imunosupresivní léčbou nelze využít IGRA testy, neboť funkce buněk produkujících IFN $\gamma$  je suprimována. Přestože počet leukocytů se u nich nelišil od pacientů nehospitalizovaných, diferenciální rozpočet obou skupin se statisticky významně lišil. U těžších forem COVID-19 dochází k poklesu počtu lymfocytů na úkor granulocytů a jejich nezralých forem (ig). Statisticky významný byl také nižší počet monocytů jako antigen-prezentujících buněk a eozinofilů. Tyto nálezy odpovídají literárním údajům [9, 10]. Zatímco koncentrace IL-1 $\beta$  v séru u skupiny jedinců s těžkým průběhem onemocnění COVID-19 se statisticky významně nelišila od koncentrace IL-1 $\beta$  skupiny jedinců 1-13 zařazených do studie, významně vyšší u nich byly v séru koncentrace IL-1ra, CRP, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 a leptinu. Statisticky významně nižší byly naopak hodnoty adiponectinu. Statisticky významně vyšší byla u hospitalizovaných jedinců také koncentrace ncAg v séru a koncentrace anti-ncAg ve třídě IgM i IgG a proti hrotovým antigenům ve třídě IgM a IgA, ne však ve třídě IgG. Tato data nebyla publikována.

## Diskuse

Cílem studie bylo ověření nových buněčných a imunoanalytických testů, které se zaváděly od r. 2020 pro diagnostiku a testování SARS-CoV-2 infekce a následného onemocnění COVID-19, které u vnímavých jedinců tento virus může vyvolat. Studii jsme zahájili v březnu 2021, kdy jsme dostali k testování IGRA testy a zapojilo se do ní prvních 13 jedinců. V červenci se do ní zapojilo dalších 11 jedinců. Většina z 24 zapojených jedinců byla otestována ještě koncem roku 2021 (Tabulka 1 přílohy). Srovnání výsledků získaných těmito testy je znázorněno na obr. 1A přílohy a bylo také prezentováno formou nástěnkového sdělení na ECCMID 2022 (Dieckmann K et al. Abstract/PresentationNumber:1896/P2131). Přes dobrou korelaci výsledků obou testů mohou být pozorované rozdíly způsobeny řadou faktorů. Firma Euroimmun používá ke stimulaci v testu antigeny připravené z S1 hrotové (spikové) oblasti viru. Firma Qiagen

používá ke stimulaci tři antigeny: antigen Pr1 stimuluje CD4+ lymfocyty pomocí epitopů obsažených v S1 subjednotce (RBD) hrotového proteinu, Pr2 stimuluje CD4+ a CD8+ lymfocyty pomocí epitopů obsažených v S1 a S2 subjednotkách hrotového proteinu a Pr3 stimuluje CD4+ a CD8+ lymfocyty pomocí epitopů obsažených v S1 a S2 subjednotkách a CD8+ lymfocyty navíc pomocí imunodominantních epitopů odvozených z celého genomu viru obsahující S, N a M proteiny. Proto bývá obvykle odpověď na Pr3 antigeny širší než na Pr1 a Pr2. Pr1 odpověď je typičtější pro časné fáze infekce a Pr2 pro pozdější fáze infekce a pro vyšetření provedená delší dobu po prodělané infekci.

Zároveň s těmito dvěma IGRA testy, kterými se stanovuje odpověď lymfocytů periferní krve na antigeny SARS-CoV-2, jsme prováděli také několik sérologických testů stanovujících protilátky proti antigenům tohoto viru, popř. stanovovali tyto antigeny. Snahou bylo ověřit především analytické parametry používaných souprav. Pro klinické ověření jsme neměli možnost získat vzorky krve u jedinců s probíhající závažnější COVID-19, poněvadž se nepodařilo navázat spolupráci s některou nemocniční koronavirovou jednotkou. Přesto jsme přesvědčeni, že výsledky naší studie jsou zajímavé a rozhodli jsme se je prezentovat v tomto článku.

Metody, které jsme ve studii používali, můžeme zařadit, až na kultivační krok IGRA testů, mezi metody imunoanalytické, tj. metody, které využívají ve svém postupu protilátky. Týká se to i použitých IRGA testů, neboť vyhodnocení kultur, které jsou prvním krokem těchto buněčných testů, se v následujícím kroku realizuje pomocí ELISA testů, které mezi imunoanalytické metody jednoznačně patří. Imunoanalytické metody nelze, bohužel, zatím standardizovat. Oficiálně to bylo dosud řečeno jen pro metody stanovující alergen-specifické IgE, ale toto konstatování platí pro tyto metody obecně, jak lze dedukovat ze zdůvodnění uvedeném pro stanovování alergen-specifického IgE [11]. Pokud srovnávané testy spolu dostatečně korelují, lze se jen snažit o unifikaci výsledků pomocí přepočítávacích faktorů a tyto metody/testy harmonizovat, tj. snažit se snížit rozptyl jejich výsledků pod klinicky významné meze. Doporučení vyplývající z výše uvedených prací je: Pokud výsledek vyšetření neodpovídá anamnéze, mělo by být provedeno toto vyšetření s jinými testovacími soupravami snad i jiných výrobců.

Abychom mohli správně hodnotit výsledky laboratorních metod, musíme si uvědomit několik skutečností: V prvním kroku se snažíme prokázat přítomnost SARS-CoV-2 viru na sliznicích nosohltanu nebo po jeho průniku dovnitř organismu pomocí detekce specifických úseků jeho RNA metodou RT-PCR, popř. průkazem a stanovením jeho antigenů imunoanalytickými technikami. Tyto metody však nevypovídají o tom, jak napadený organismus člověka na virus reaguje a v jakém stavu se na sliznicích nachází.

Při nízkých infekčních dávkách viru a dobré kondici nemusí postižený jedinec pocítit žádné nebo jen slabé zdravotní potíže, které jsou podobné jako u běžných respiračních onemocnění a které zmizí do několika málo dní. Vyšší dávky viru způsobí vyšší pravděpodobnost, že se virus dostane v některé části nosohltanu nebo

dokonce i dále v dýchací nebo trávicí cestě dovnitř postiženého organismu a způsobí silnější aktivaci jeho imunitního systému spojenou se zánětem a s ním spojené zdravotní potíže. Proto je důležité, aby výsledky RT-PCR testů byly udávány alespoň v ct jednotkách, které udávají replikační cyklus, v němž signál cyklu překročí nastavenou hodnotu cut-off a výsledky imunoanalytických testů stanovující antigeny v jednotkách udávajících jejich kvantitu. V obou případech je optimální, pokud jsou tyto hodnoty přepočítány na TCID50 (50% tissue culture infection dose), která kvantifikuje infekčnost viru [12] a pomůže při harmonizaci jednotlivých testů. Máme-li podezření a diagnostikujeme-li infekci SARS-CoV-2 až několik dní po výskytu příznaků, kdy už by na ni imunitní systém postiženého organismu měl reagovat i tvorbou protilátek, je kromě RT-PCR a antigenních testů ze stěrů z nosohltanu zapotřebí provést také stanovení (nejen detekci) IgG a IgA protilátek v séru, popř. plné krvi, které nám mohou potvrdit naše podezření na probíhající infekci SARS-CoV-2 a ukázat, že virus pronikl přes sliznice dovnitř organismu. K tomu můžeme dnes využít i stanovení nukleokapsidových antigenů v séru [13, 14], plasmě nebo plné krvi, popř. RT-PCR ze stolice [15].

Mluvíme-li o člověku a jeho imunitním systému, musíme si uvědomit, že člověk je složitý organismus skládající se z jeho eukaryotické části, z jeho mikrobiomu, viromu, popř. dalších symbiotických organismů (obr. 3A přílohy) [16-20]. Jeho imunitní systém však dnes chápeme většinou jako významný homeostatický systém realizovaný buňkami produkovanými během hematopoézy a jejich produkty. Na udržování homeostázy se však podílejí všechny systémy člověka, které spolu vzájemně komunikují. Využívány jsou i mechanismy, které jsou fylogeneticky mnohem starší, než je imunitní systém jeho eukaryotické části tak, jak jej dnes většinou chápeme (obr. 3B přílohy). První reakce na porušení homeostázy je vždy nespecifická a podílejí se na ní významně buňky a jejich produkty mimo buňky vzniklé během hematopoézy. Mechanismy specifické imunitní reakce nastupují až v další fázi a zefektivňují první nespecifickou fázi imunitní reakce [21-23].

Nespecifická imunitní reakce je založena na mechanismech a produktech fylogeneticky mnohem starších, než jsou produkty imunitního systému, jak je dnes většinou chápán. Tato nespecifická, přirozená imunita se formuje během života, vlivem prostředí, ve kterém jedinec žije, nejintenzivněji v raném věku [20]. Významnou úlohu pochopitelně hrají i vrozené genetické predispozice ve vztahu ke genetickému vybavení infekčního agens. Ukázalo se, že existují určité asociace genotypu člověka a genotypu SARS-CoV-2, které predisponují člověka k těžším průběhům COVID-19 a poškození různých tkání a orgánů tímto onemocněním [24-26].

V rámci studie, jejíž součástí byly původně jen buněčné testy, byly i testy stanovující protilátky proti SARS-CoV-2. Vzájemné korelace těchto protilátek s buněčnými testy jsou uvedeny v Tabulce 3 přílohy. Korelace IGRA testu firmy Euroimmun s protilátkovými testy téže firmy jsou uvedeny také na obr. 1D přílohy. Vyplývá z nich, že i když korelace jsou statisticky významné, nelze výsledky těchto vyšetření u konkrétního

jedince hodnotit bez podrobné znalosti jeho anamnézy a je nutno při tom brát v úvahu, že jeho reaktivita v těchto testech a následně v průběhu tzv. dlouhého covidu, který může následovat a který má řadu projevů, se může na základě jeho genetického a epigenetického vybavení i výrazně lišit [24]. Platí to pro testy protilátkové i buněčné. Je však předpoklad, že se podaří najít sadu běžně dostupných analytů v séru, které dokážou vytipovat jedince predisponované k těžším průběhům COVID-19 po infekci SARS-CoV-2 [26].

Ukazuje se, že v boji proti onemocnění COVID-19 bude nutno zřejmě provést řadu změn jak v diagnostice, tak v terapii tohoto onemocnění, a to především v jeho časných stadiích. Co se týče diagnostiky, musí být rychlá a cenově dostupná. To by mohl splňovat podle dosavadních zkušeností s tímto testem, např. mimo jiné POCT test firmy Biouhan HIT-180 Analysis system, který dovoluje stanovit během cca 15 min. po odběru materiálu s dostatečnou citlivostí koncentraci nukleokapsidových antigenů SARS-CoV-2 v eluátech stěrů z nosohltanu, v séru nebo plné krvi a množství protilátek proti spike proteinům SARS-CoV-2 v 10 µl kapkách vzorku za technicky nenáročných a cenově velmi příznivých podmínek (viz HIT-180 Analysis System, <https://www.biouhan.com/AgS/index.aspx>). Nabízí se proto, aby tento test byl dostupný nejen na všech příjmových koronavirových jednotkách nemocnic, ale i u praktických lékařů.

Zásadní podmínkou kvalitní laboratorní diagnostiky je, aby v diagnostice COVID-19 byly používány jen prověřené a validované testy, což nebylo a ani nemohlo být dodrženo při prvním ataku infekce na konci roku 2019, ale je již možné a dostupné dnes. Jen standardizovaná diagnostika validovanými testy může být přínosem pro racionální léčbu COVID-19, jinak může být zavádějící [4,21,27,28].

Podobné je to i s léčbou infekce SARS-CoV-2 a COVID-19. Jejich léčba v časných stadiích musí být navíc dobře dostupná a ekonomicky akceptovatelná. Její součástí je i podání antivirotik [29], na jejichž vývoji se stále intenzivně pracuje. Ta mají zabraňovat replikaci viru a znemožnit mu infikovat další buňky. K tomu mohou pomoci, především v časných fázích infekce a onemocnění, i léky, které jsou primárně určeny k terapii jiných onemocnění [30-33], jsou dobře dostupné a relativně levné. Lokálně je u lidí, kteří nejsou alergičtí na jód, vhodné aplikovat např. volně dostupný jodovaný povidon ve formě kloktadla a včasnou imunoregulační léčbu v domácím ošetřování lékařem lékem montelukast ve formě tablet, který má vynikající bezpečnostní profil. Podpůrně se osvědčuje také celkově volně dostupný je N-acetylcystein, vitamin D3 a vitamin C. Již lokální léčba jodovaným povidonem významně redukuje virovou nálož, která bývá v počátečních stadiích infekce velmi vysoká ve slinách. Zvyšuje se bezpečnost a kvalita života pacienta a předchází se tak také preventivně postcovidovým komplikacím. Pacient je pod kontrolou lékaře, který může léčbu dle vývoje stavu upravovat a v případě potřeby intenzifikovat, včetně použití dalších imunoregulačních, antikoagulačních a protivirotických léků [10,34-37].

Přibývá prací, které ukazují, jak již bylo řečeno, že především v časných fázích infekce je významná přirozená imunita, která není založena na protilátkách a aktuální reaktivitě T-lymfocytů. Je realizována faktory a mechanismy, které jsou fylogeneticky mnohem starší než T-lymfocyty a plazmatické buňky produkující protilátky. Jak specifická buněčná a humorální imunita, tak přirozená imunita mají svou paměť, která zefektivňuje imunitní odpověď organismu při opakovaném styku s daným infekčním agens. Na formování přirozené imunity se mj. podílí významně i výživa [38]. Specifická buněčná a humorální imunita, tak jak ji dnes chápeme, jen zefektivňuje primární přirozenou imunitní odpověď [20,39-44].

Vzhledem k vysokému množství mutací vznikajících permanentně u SARS-CoV-2 především v oblasti jeho hrotových (spike) proteinů a vytvářejících jeho jednotlivé varianty, bylo zřejmě chybou zaměřit se v rutinní laboratorní diagnostice i v konstrukci vakcín založených na těchto přísně specifických znacích jednotlivých variant vyvolávajících u lidí onemocnění [45,46]. Také zatím doporučená pravidelná, více méně plošná a neodůvodněná revakcinace proti tomuto viru může být často pro vakcinovaného jedince spíše škodlivá než prospěšná [39,47,48].

## Závěry

1. Výsledky vyšetření buněčné i humorální imunity nelze interpretovat bez znalosti anamnézy vyšetřovaného jedince.
2. Nelze jednoznačně určit obecně platné dostatečné ochranné hladiny analyzovaných parametrů buněčné a humorální imunity. Vyšší hladiny však dávají předpoklad, že jedinec se bude úspěšněji bránit při opakovaném ataku SARS-CoV-2.
3. Vhodně aplikované laboratorní testy výrazně pomáhají při potvrzení nebo vyloučení anamnézy, která vedla k podezření na SARS-CoV-2 infekci.
4. Poněvadž terapii je nutno nasadit co nejdříve po zjištění a potvrzení anamnézy, je zapotřebí, aby výsledky laboratorních vyšetření byly k dispozici již v den odběru vzorků na tato vyšetření. To není možné u funkčních testů na buněčnou imunitu, mezi které patří i IGRA testy. Proto budou tyto testy v rutinní analytice sloužit pravděpodobně jen pro konfirmaci testů stanovujících protilátky, které jsou dnes běžně dostupné a jsou také levnější než IGRA testy, pokud jejich výsledky nebudou odpovídat anamnéze.
5. S výhodou lze v současnosti využít i nově vyvinuté rychlé POCT metody a měřicí systémy obzvláště s důrazem na to, že s jejich akreditací (tedy i validací a verifikací a dalšími analytickými i klinickými aspekty) plně počítá nová norma ČSN EN ISO 15189 ed. 3:2023 „Zdravotnické laboratoře - Požadavky na kvalitu a kompetenci (ČAS-ČIA 2023)“.



## Literatura

1. **Lochman I., Thon, V., Kratochvíla, J.** Care options for individuals affected by SARS-CoV-2 Infection. Accessible on: [\[odkaz\]](#)
2. **Marra, A. R., Kobayashi, T., Suzuki, H. et al.** The effectiveness of coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine in the prevention of post-COVID-19 conditions: A systematic literature review and meta-analysis. *ASHE*, 2022, 2(1), e192, s. 1-11. [\[odkaz\]](#)
3. **Wahl, I., Wardemann, H.** Sterilizing immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*, 2022, 55, s. 2231-2235. [\[odkaz\]](#)
4. **Plizák, Z., Kratochvíla, J., Friedecký, B., Šprongl, L.** Recommendation for validation and verification of laboratory examination procedures in medical laboratories. *Klin. Biochem. Metab.*, 2021, 29 (50), s. 78-83. [\[odkaz\]](#)
5. **Lochman I., Thon, V., Kratochvíla, J.** Příloha/Supplement. Dostupný také na: [\[odkaz\]](#)
6. **Grage-Griebenow, E., Stiba, K., Zapf, D. et al.** T cell and antibody responses after SARS-CoV-2 infection and vaccination using a new IFN $\gamma$  release assay. *Poster ID 387946* on 24th Annual ESCV Conference, Manchester, UK, September 7th-10th 2022
7. **Dugas, M., Grote-Westrics, T., Vollenberg, R. et al.** Less severe course of COVID-19 is associated with elevated levels of antibodies against seasonal coronaviruses OC43 and HKU1 (HCoV OC43 and HCoV HKU1). *Int J Infect. Dis.*, 2021, 105, s. 304-306. [\[odkaz\]](#)
8. **Berche, P.** The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: A coronavirus? *La Presse Médicale* 2022, 51(3), s. [\[odkaz\]](#)
9. **Gopalan, N., Senthil, S., Prabakar, N. L. et al.** Predictors of mortality among hospitalized COVID-19 patients and risk score formulation for prioritizing tertiary care—An experience from South India. *PLoS ONE*, 2022, 17(2), s. e0263471. [\[odkaz\]](#)
10. **Shet, M., Westover, J., Hong, R. et al.** In vitro inactivation of SARS-CoV-2 using a povidone-iodine oral rinse. *BMC Oral Health*, 2022, 22(1), 47. [\[odkaz\]](#)
11. **Cox, L., Williams, B., Sicherek, S., et al.** Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2008, 101(6), s. 580-92. [\[odkaz\]](#)
12. **Lei, C., Yang, J., Hu, J. et al.** On the calculation of TCID $_{50}$  for quantitation of virus infectivity. *Virology*, 2021, 36(1), s. 141-144. [\[odkaz\]](#)
13. **Li, T., Wang, L. et al.** Serum SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: a sensitivity and specificity early diagnostic marker for SARS-CoV-2 infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, [\[odkaz\]](#)
14. **Perna, F. et al. 2021.** Serum levels of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen associated with inflammatory status and disease severity in COVID-19 patients. *Clin. Immunol.*, 2021, 226, 108720. [\[odkaz\]](#)
15. **Ge, R., Chen, Z., Liu, X., et al.** Positive stool test results suggest that the discharge standard for COVID-19 needs improvement. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2021, 74(1), s. 76-78. [\[odkaz\]](#)
16. **Bailey, M., Christoforidou, Z, Lewis, M.** Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity. *Autoimmun. Rev.*, 2013,12(6), s. 643 - 647. [\[odkaz\]](#)
17. **Boehm, T.** Evolution of vertebrate immunity. *Current Biology*, 2012; 22(17), s. R722-R732. [\[odkaz\]](#)
18. **Gilbert, S. F.** Symbiosis as the way of eukaryotic life: the dependent co-origination of the body. *J Biosci.* 2014, 39(2), s.201-209. [\[odkaz\]](#)
19. **Rosenberg, E., Sharon, G., Atad, I., Zilber-Rosenberg, I.,** The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Appl. Microbiol. Int.*, 2010, 2(4), s. 500-506. [\[odkaz\]](#)
20. **Schneider, T.** The holobiont self: understanding immunity in context. *Hist. Philos. Life Sci.*, 2021, 43(3), 99. [\[odkaz\]](#)
21. **Lochman, I., Kratochvíla, J., Friedecký, B.** Laboratorní diagnostika COVID-19. *Klin. Biochem. Metab.*, 2020, 28/ 49(3), s. 93-96. [\[odkaz\]](#)
22. **Zinkernagel, R. M.** Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol. Rev.*, 2002, 185, s.103-125. Erratum in: *Immunol. Rev.*, 2002, 187, 139. [\[odkaz\]](#)
23. **Zinkernagel, R. M.,** What is missing in immunology to understand immunity? *Nat. Immunol.*, 2000, 1, s. 181-185. [\[odkaz\]](#)
24. **D'Antonio, M., Nguyen, J. P., Arthur, T. D. et al.** SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 disease severity are associated with genetic variants affecting gene expression in a variety of tissues. *Cell Rep.*, 2021, 37(7), s. 110020. Erratum for: *Cell Rep.* 2022, 39(11):110968. [\[odkaz\]](#)
25. **LoPresti, M., Beck, D. B., Diggall, P. et al.** The Role of host genetic factors in Coronavirus susceptibility: Review of animal and systematic review of human literature. *Am. J Human. Genet.*, 2020, 107, s. 381-402. [\[odkaz\]](#)
26. **Tanha, H. M., Sathyanarayanan, A., Mehta, D., Nyholt, D. R.** Shared genetic influences between blood analyte levels and risk of severe COVID-19. *Cell Rep.*, 2022, 41, 111708. [\[odkaz\]](#)
27. **Knezevic, I., Mattiuzzo, G., Page, M. et al.** Complexity of serological assays and misunderstandings of WHO International Units. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2022, 60(10), e223 - e224. [\[odkaz\]](#)
28. **Plebani, M. and Lippi, G.** Standardization and harmonization in laboratory medicine: not only for clinical chemistry measurands. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2023, 61(2): s. 185-187. [\[odkaz\]](#)
29. **Buszko, M. H., Jung-Hyun, P., Verthelyi, D., et al.** The dynamic changes in cytokine responses in COVID-19: a snapshot of the current state of knowledge. *Natural Immunology* 2020, 21, s. 1146-1151. [\[odkaz\]](#)
30. **Barre, J., Sabatier, JM., Annweiler, C.** Montelukast drug may improve COVID-19 prognosis: A Review of evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, published in September 2020, Volume 11: Article 1344. [\[odkaz\]](#)
31. **Knobe, R. T., and Owen, L.** A systematic review of experimental evidence for antiviral effects of ivermectin and an in silico analysis of ivermectin's possible mode of action against SARS-CoV-2. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2021, 35(2), s. 260-276. [\[odkaz\]](#)
32. **Ma, C., Tan, H., Choza, J. et al.** Validation and inactivation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays. *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, 12(4), s. 1636-1651. [\[odkaz\]](#)
33. **Zaidi, A. K., Dehgani-Mobaraki, P.** The mechanisms of action of ivermectin against SARS-CoV-2—an extensive review. *J Antibiot.*, 2022, 75, s. 60-71. [\[odkaz\]](#)
34. **Camera, M., Canzano, P., Brambilla, M., Rovati, G. E.** Montelukast inhibits platelet activation induced by plasma from COVID-19 patients. *Front Pharmacol*, 2022, 13, s.784214. [\[odkaz\]](#)
35. **Hassandarvish, P., Tiong, V., Mohamed, N. A. et al.** In vitro virucidal activity of povidone iodine gargle and mouthwash against SARS-CoV-2: implications for dental practice. *Br. Dent. J.*, 2020, Dec 10, s. 1-4. [\[odkaz\]](#)
36. **Kerget, B., Kerget, F., Aydın, M., Karaşahin, Ö.** Effect of montelukast therapy on clinical course, pulmonary function, and mortality in patients with COVID-19. *J Med. Virol.*, 2022, 94(5), s. 1950-1958. [\[odkaz\]](#)

37. **Khan, A. R., Misdary, C., Yegya-Raman, N. et al.** Montelukast in hospitalized patients diagnosed with COVID-19. *J Asthma*, 2022, 59(4), s. 780-786. [odkaz]
38. **Šima, P., Bencko, V.** Výživa jako primární podpora imunity. *Prakt. Léčk.*, 2022, 102(2), s. 51-54. [odkaz]
39. **Bhattacharya, D.** Instructing durable humoral immunity for COVID-19 and other vaccinable diseases. *Immunity*, 2022, 55, s. 945-964. [odkaz]
40. **Graham, A. L., Schrom, E. C., Medcalf, C. J. E.** The evolution of powerfully et perilous immune systems. *Tr. Immunol.*, 2021,43(2), s. 117-131. [odkaz]
41. **Kent, S. J., Khoury, D. S., Reynaldi, A. et al.** Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19. Leading actors or supporting cast? *Nat. Rev. Immunol.*, 2022, 22, s. 387-97. [odkaz]
42. **Tomalka, J. A., Suthar, M. S., Diamond, M. S., and Sekaly, R. P.** Innate antiviral immunity: how prior exposures cab guide future responses. *Trends Immunol.*, 2022, 43(9), s. 696-705. [odkaz]
43. **Vetvicka, V., Sima, P., Vannucci, L.** Trained immunity as an adaptive branch of innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10684. [odkaz]
44. **Ziogas, A., Netea, M. G.** Trained immunity-related vaccines: innate immune memory and heterogenous protection against infection. *Trend. Mol. Med.*, 2022, 28(6), s. 497-512. [odkaz]
45. **Silva-Sanchez, A. and Randall, T. D., Spiking SARS-CoV-2 antiviral immunity in the respiratory tract, Tr. Immunol., 2023, 44(2), s. 87-89. [odkaz]**
46. **Wang, Q., Iketani, S., Li, Z., Liu, L., Guo, Y., Huang, Y.** Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell*, 2023, [odkaz]
47. **Bogeska, R., Mokecin, A. M., Kaschutnik, P. et al.** Inflammatory exposure drives long-lived impairment of hematopoietic stem cell self-renewal activity and accelerated aging. *Cell Stem Cell* 2022; 29(8): 1273-1284. e8. [odkaz]
48. **Petráš, M., Máčalík, R., Janovská, D. et al.** Risk factors affecting COVID-19 vaccine effectiveness identified from cross-country observational studies until February 2022: a meta-analysis and meta-regression. *BMC Medicine* 2022; 20:461 [odkaz]

Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 23. 1. 2023

Adresa pro korespondenci:  
 RNDr. Ivo Lochman, CSc.  
 konzultant pro imunologii a alergologii  
 Spadia Lab  
 Dr. Martinka 7  
 700 30 Ostrava-Hrabůvka  
 Email: ivo.lochman@spadia.cz

## Tables and figures

**Table 1.** List of patients included in the study

age (years)	gender	onset of symptoms	duration of symptoms	COVID-19 symptoms	disease progression	vaccine	date of 1 <sup>st</sup> vaccine dose	date of 2 <sup>nd</sup> vaccine dose	date of 3 <sup>rd</sup> vaccine dose	1. blood collection	2. blood collection	3. blood collection	4. blood collection
26.6	F	19.10.2020	20.10.2020	4,6	2	Pfizer	16.4.2021	28.5.2021		2.3.2021	13.7.2021	25.11.2021	
26.0	F	8.10.2020	16.10.2020	1,3,4,5,6,7,11	3	Pfizer	16.4.2021	28.5.2021		2.3.2021	14.7.2021	4.1.2022	
73.5	F	21.3.2020	31.3.2020	2,4,5	3	Pfizer	18.1.2021	8.2.2021	30.11.2021	3.3.2021	13.7.2021	2.11.2021	4.1.2022
75.7	M	16.12.2019 19.9.2022	20.12.2019 21.9.2022	4,5,7 2,4,12	2 2	Pfizer	18.1.2021	8.2.2021	7.12.2021	2.3.2021	14.7.2021	25.11.2021	4.1.2022
30.6	F	25.11.2020	10.12.2020	1,4,5,6,7,9	3					2.3.2021	21.7.2021		
57.0	F	7.12.2020	10.12.2020	1,4,5	2	Moderna	17.4.2021	29.5.2021		2.3.2021	14.7.2021	6.12.2021	
71.5	M	20.12.2019 1.4.2022	20.12.2019 4.4.2022	11 2,9	2 2	Pfizer	22.1.2021	12.2.2021	12.11.2021	3.3.2021	21.7.2021	2.11.2021	6.12.2021
57.2	F	17.10.2020	9.11.2020	1,3,4,7	3	Jansen	21.10.2021			2.3.2021	12.7.2021	23.11.2021	
67.7	M	10.12.2020	20.12.2020	1,2,3,4	3	Pfizer	30.6.2021			8.3.2021	19.7.2021	6.1.2022	
61.8	M	15.12.2020	23.12.2020	1,5,7,9,11	2					2.3.2021			
64.7	F	11.12.2020	18.12.2020	1,4	2	Pfizer	30.4.2021	11.6.2021		8.3.2021	19.7.2021	6.1.2022	
42.0	F					Phizer	24.5.2021	17.6.2021		8.3.2021		6.1.2022	
63.0	F	17.11.2020	23.12.2020	1,5,6	3	Pfizer	1.6.2021	13.7.2021		8.3.2021	19.7.2021		
59.7	M	28.1.2022	1.2.2022	1	1	Pfizer	21.1.2021	11.2.2021		4.2.2021	19.7.2021	6.12.2021	
57.3	M	15.10.2020	20.10.2020	2,4,	2	Moderna	16.3.2021	16.4.2021	30.11.2021		15.7.2021	23.11.2021	3.1.2022
33.5	F				1	Pfizer/Mod 3.d	22.1.2021	12.2.2021	3.1.2022	1.2.2021	14.7.2021	2.11.2021	
41.1	F	18.12.2020	28.12.2020	7	2	Pfizer	30.3.2021	20.4.2021	10.1.2022		15.7.2021	6.12.2021	
39.6	M	2.2.2021	27.2.2021	2,4	2	Pfizer	16.4.2021	3.8.2021			13.7.2021	4.1.2022	
36.9	F				1	Pfizer	19.2.2021	12.3.2021			15.7.2021	23.11.2021	
35.6	F	10.12.2022	15.12.2022	1,4	3	Pfizer	19.2.2021	12.3.2021			15.7.2021	23.11.2021	
22.1	F	24.1.2022	28.1.2022	1.4.8	3	Pfizer	19.2.2021	12.3.2021			21.7.2021	25.11.2021	
54.7	F				1	Pfizer	7.5.2021	18.6.2021			13.7.2021	6.1.2022	
50.9	F				1	Pfizer	21.1.2021	11.2.2021	5.11.2021		12.7.2021	2.11.2021	10.1.2022
36.5	F	17.12.2020	23.12.2020	1,6,7,9	2	Pfizer	16.4.2021	28.5.2021			21.7.2021	6.1.2022	

The samples for this study were collected from a total of 24 individuals in 3 runs at heterogeneous timepoints before, during or after vaccination. 19 individuals were included in the first run of sample collection, which took place in March 2021. Thirteen of them (no. 1-13) were at that time free from health problems. Ten of them (no. 1-3, 5, 6, 9-11 and 13) had experienced the disease in the past, before the first sampling, as confirmed by RT-PCR or antigen tests in the symptomatic disease phase. Three (no. 4, 7, and 8) likely experienced SARS-CoV-2 infection prior to the start of this study. They had symptoms but no nasopharyngeal swabs were tested for viral RNA or antigens at the time of symptoms, but they later showed positive antibodies to SARS-CoV-2 antigens after the symptoms had subsided. In one case (no. 12), SARS-CoV-2 infection had not been detected before vaccination. Individual no. 10 was excluded from the second run of the study due to health complications and no. 5 due to ongoing pregnancy. Informed consent to participate in this study

was obtained from all subjects included in the study, as well as from another 11 subjects who did not enter the study until the 2nd run of the study in July 2021. Six subjects (no. 14-19) who were originally included in the study and examined in the first run in March were ultimately not included in the study because the ICUs where they had been hospitalized were not interested in further cooperation. While in the first run of the study, only three individuals were vaccinated before the first blood collection, in the second all but two individuals were fully vaccinated (i.e. had received the second vaccine dose) before blood sampling. Only the first dose of the vaccine was administered to subject no. 9, as he had a very strong reaction after it. An overview of the individuals included in the study and their data for clinical pre-characterization and vaccination status is shown in the table. The third run of the study took place at the turn of 2021 and 2022, but not all individuals took part in it. Individuals 3, 4, 7, 9 and 20 were examined several times outside of the planned 3 runs.

**Table 2.** Symptoms and the course of the disease classification

symptoms of COVID-19 according to the CDC		course of COVID-19	
1	fever and chills	1	without symptoms
2	cough	2	light
3	shortness of breath or difficulty breathing	3	moderate
4	fatigue	4	severe
5	muscle or body pain	5	severe + hospitalization
6	headaches		
7	loss of taste or smell		



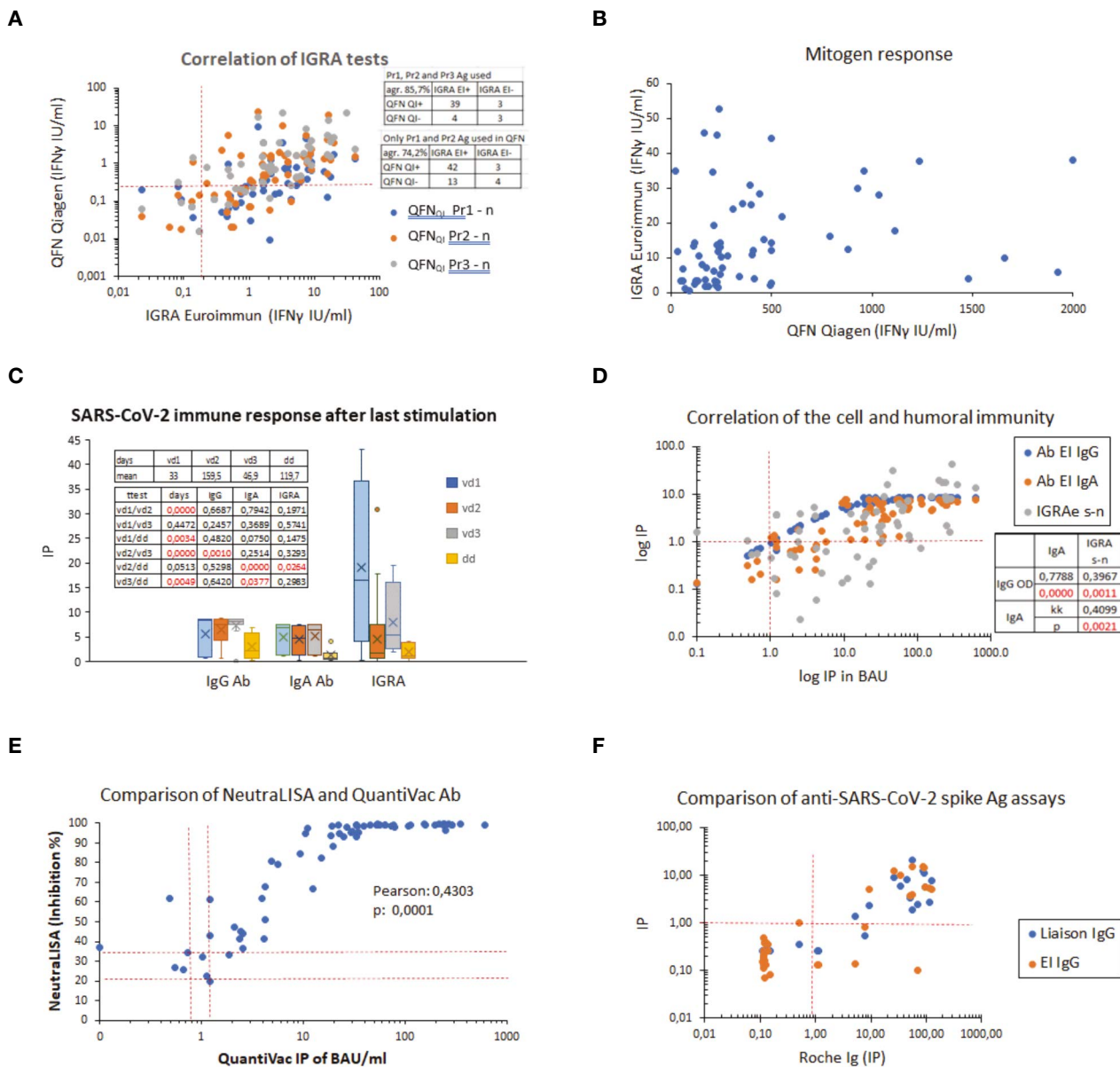
**Table 3.** Correlations among measured variables

	IP IgG OD	IP IgG CV	QV BAI	IP IgA	IP ncp IgG	neutra LISA	leuko	lymph	mono	eos	baso	ig	IGRA n	IGRA s	IGRA m	IGRA s-n	QFN n	QFN Pr1	QFN Pr2	QFN Pr3	QFN m	QFN Pr1-n	QFN Pr2-n	QFN Pr3-n	
IP IgG OD	1																								
IP IgG CV	0.5180 0.0000	1																							
QV BAI	0.5143 0.0000	0.9991 0.0000	1																						
IP IgA	0.7788 0.0000	0.6708 0.0000	0.6703 0.0000	1																					
IP ncp IgG	0.1699 0.1628	0.281 0.0193	0.2797 0.0199	0.1025 0.4522	1																				
neutra LISA	0.9369 0.0000	0.4447 0.0001	0.4410 0.0001	0.7504 0.0000	0.0895 0.4647	1																			
leuko	0.1069 0.4081	0.0493 0.7037	0.0550 0.6713	0.0949 0.5076	0.0859 0.5069	0.0558 0.6666	1																		
lymph	0.1069 0.4081	0.0493 0.7037	0.0550 0.6713	0.0949 0.5076	0.0859 0.5069	0.0558 0.6666	0.5807	1																	
mono	0.0551 0.6707	0.0187 0.8853	0.0197 0.8789	0.0223 0.8768	0.054 0.7832	0.0357 0.0000	0.6957 0.1185	0.2003	1																
eos	0.2906 0.0219	0.1251 0.3327	0.1284 0.3201	0.1888 0.1846	0.0337 0.7948	0.1997 0.1197	0.5022 0.0000	0.3514 0.0051	0.1599 0.2145	1															
baso	0.0532 0.6815	0.1261 0.3289	0.1196 0.3547	0.0459 0.7489	0.1990 0.1210	0.0330 0.7991	0.5330 0.0000	0.3474 0.0057	0.4010 0.0012	0.4374 0.0004	1														
ig	0.1609 0.2117	0.2393 0.0610	0.2431 0.0569	0.2603 0.0651	0.2712 0.0330	0.0897 0.4880	0.3562 0.0045	0.1049 0.4171	0.1485 0.2494	0.2600 0.0413	0.4571 0.0002	1													
IGRA n	0.1082 0.3948	0.1586 0.2106	0.1581 0.2122	0.0585 0.6776	0.0707 0.5790	0.0568 0.6559	0.2301 0.0770	0.1414 0.2813	0.2371 0.0681	-0.0021 0.9872	0.1214 0.3555	0.3000 0.0199	1												
IGRA s	0.3937 0.0012	0.5773 0.0000	0.5783 0.0000	0.4285 0.0012	0.2837 0.0220	0.3365 0.0061	-0.1964 0.1292	-0.0414 0.7514	-0.2570 0.0455	-0.0092 0.9439	-0.0787 0.5464	0.0777 0.5518	-0.0701 0.5819	1											
IGRA m	-0.0503 0.6906	-0.0400 0.7519	-0.0392 0.7564	-0.0348 0.8028	0.1046 0.4069	-0.0125 0.9213	0.3242 0.0108	0.0177 0.8922	-0.3415 0.0071	-0.2624 0.0411	-0.1687 0.1938	-0.0483 0.7119	-0.0110 0.9312	0.1731 0.1678	1										
IGRA s-n	0.3967 0.0011	0.5098 0.0000	0.5012 0.0000	0.4099 0.0021	0.2498 0.0447	0.3493 0.0043	-0.2325 0.0714	-0.0624 0.6330	-0.2546 0.0476	-0.0298 0.8196	-0.0398 0.7605	0.0473 0.7176	-0.0814 0.5226	0.9644 0.0000	0.1777 0.1566	1									
QFN n	0.1093 0.3939	0.1352 0.2908	0.1386 0.2785	0.0914 0.5193	0.1232 0.3363	0.095 0.459	-0.2102 0.1039	-0.0853 0.5135	-0.2693 0.0358	-0.2381 0.0646	-0.203 0.1167	-0.0929 0.4765	-0.0611 0.6370	0.1583 0.2152	0.2220 0.0804	0.1074 0.4021	1								
QFN Pr1	0.249 0.055	0.0842 0.5225	0.0871 0.5082	0.1953 0.174	0.0454 0.7308	0.1892 0.1477	-0.1329 0.3199	0.0862 0.5202	-0.2082 0.1108	-0.0227 0.8657	-0.1685 0.2060	-0.0596 0.6570	-0.0012 0.9927	0.2184 0.0936	0.2193 0.0922	0.2007 0.1241	0.4480 0.0003	1							
QFN Pr2	0.2879 0.0233	0.0760 0.5573	0.0778 0.5480	0.2734 0.0522	0.1114 0.3885	0.2347 0.0663	-0.1181 0.8009	0.0333 0.8009	-0.2257 0.0830	0.0166 0.8996	-0.1832 0.1611	-0.0793 0.5674	-0.0703 0.5903	0.1937 0.1313	0.1591 0.2167	0.1845 0.1510	0.4663 0.0001	0.9142 0.0000	1						
QFN Pr3	0.2930 0.0389	0.0721 0.6187	0.0737 0.6109	0.1632 0.3080	0.1982 0.1677	0.2176 0.1290	-0.3113 0.0313	-0.1207 0.4138	-0.4346 0.002	-0.0483 0.7447	-0.2052 0.1617	-0.0852 0.5647	-0.0728 0.6193	0.3818 0.0062	0.1342 0.3527	0.3686 0.0084	0.4144 0.0028	0.8147 0.0000	0.8594 0.0000	1					
QFN m	-0.189 0.1378	-0.1832 0.1506	-0.1789 0.1606	-0.2306 0.1001	-0.0926 0.4703	-0.1971 0.1216	-0.0735 0.5734	0.0708 0.5878	-0.0966 0.4589	-0.1912 0.1398	-0.1877 0.1475	-0.1004 0.4415	0.1296 0.3155	-0.0992 0.4391	0.2227 0.0794	-0.1254 0.3275	0.1835 0.1500	0.2529 0.0512	0.1432 0.2670	0.102 0.4808	1				
QFN Pr1-n	0.2444 0.0555	0.0817 0.5302	0.0838 0.5175	0.2013 0.1505	0.0423 0.7443	0.1806 0.1601	-0.1176 0.3708	0.1025 0.436	-0.1946 0.1361	0.0025 0.9849	-0.1682 0.1988	-0.0569 0.6660	0.0079 0.9519	0.7211 0.0842	0.1816 0.1578	0.2097 0.1019	0.3722 0.0029	0.9964 0.0000	0.9047 0.0000	0.8143 0.0000	0.2136 0.0953	1			
QFN Pr2-n	0.2889 0.0228	0.0720 0.5781	0.0737 0.5691	0.2751 0.0507	0.1089 0.3995	0.2355 0.0654	-0.116 0.3774	0.0348 0.7916	-0.2235 0.0861	0.0233 0.8596	-0.1809 0.1665	-0.0696 0.5726	0.1943 0.5938	0.1546 0.1302	0.1871 0.2303	0.4376 0.1454	0.9129 0.0004	0.9995 0.0000	0.8616 0.0000	0.1386 0.2826	0.9060 0.0000	1			
QFN Pr3-n	0.2950 0.0376	0.0766 0.5971	0.0780 0.5901	0.1634 0.3072	0.1973 0.1696	0.2189 0.1266	-0.3095 0.0323	-0.1186 0.4219	-0.4336 0.0021	-0.0422 0.7758	-0.2009 0.171	-0.0821 0.5789	-0.0723 0.6217	0.3846 0.0058	0.1295 0.3702	0.3720 0.0078	0.3894 0.0052	0.8081 0.0000	0.8522 0.0000	0.9996 0.0000	0.0976 0.5000	0.8101 0.0000	0.8554 0.0000	1	

cc: correlation coefficient: the higher the value, the closer the correlation  
 p - significance of cc: the lower the value, the higher the significance of the correlation  
 n - number of compared samples

The pwcrr function from the Stata V7 statistical package was used to calculate correlations. Pearson positive correlations are marked in red and negative correlations in blue with a significance of  $p < 0.05$ ,  $p$  indicates the probability that the results of the compared quantities are not correlated. The higher is the correla-

tion coefficient (cc), the lower is the significance of the null hypothesis ( $p$ ), i.e. that the compared quantities are not correlated. Typically, absolute values of cc between 0 and 0.3 are considered weak correlations, 0.4-0.5 are considered moderate, while anything between 0.6 and 1 is treated as a strong correlation.



**Fig. 1:** Selected tests results comparison

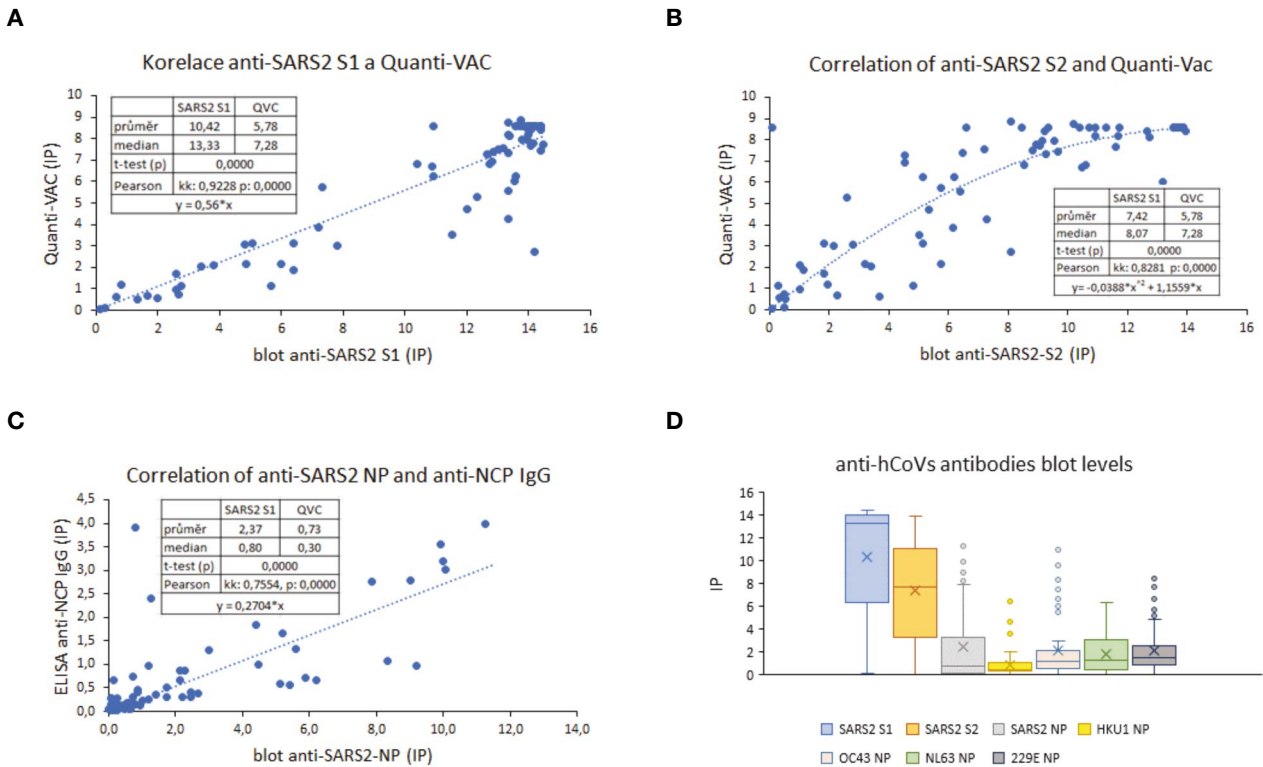
Dashed red lines indicate the positivity limits (cut-off) between positive and negative samples in images A, D and F, and areas of inconclusive (borderline) values in image E. In Figure C, the last event is either the date of vaccination or the disappearance of symptoms of the past COVID-19. The Roche diagnostics were determined in Figure F for total antibodies against SARS-CoV-2 spike antigens, while the EUROIMMUN and DiaSorin (Liaison) diagnostics only IgG antibodies.

The box plot in Figure C shows the distribution of

the data into quartiles and highlights the median and outliers. The median is shown inside the box with a horizontal line and the mean with a cross. Vertical whiskers indicate minimum and maximum. Plotted points below the minimum and above the maximum are considered outliers.

vd1 first vaccine dose, vd2 second vaccine dose, vd3 third vaccine dose, dd disease disappear

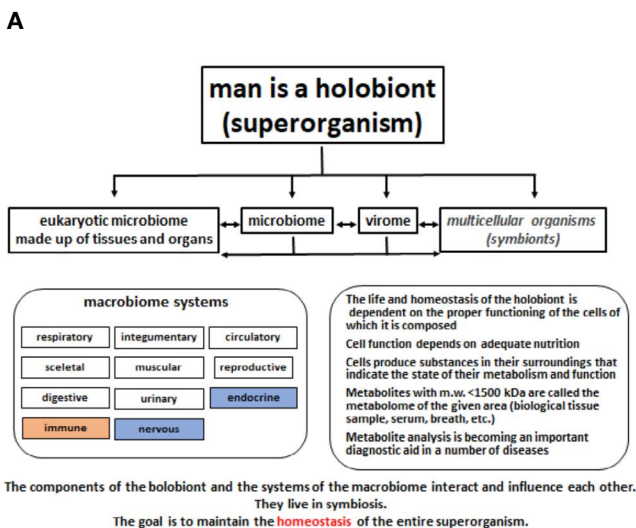
IgG Ab, IgA Ab and IGRA were tested using EUROIMMUN kits



**Fig. 2:** Correlation of blot and ELISA determination of anti-spike and anti-NCP antibodies and the detected concentration of anti-hCoV antibodies by blot

SARS2-NP IP does not differ from OC43 NP, NL63 NP and 229E NP IP values, OC13 NP IP values from NL63 NP and 229E NP IP values, and NL63NP IP va-

lues from 229E NP values when compared by t-test. Other measured values in columns are statistically different from each other ( $p < 0.0001$ )



**B**

**The immune system (IS) and its function**

**IS is the homeostatic system that, together with other homeostatic systems, ensures the internal integrity and external individuality of the organism**

**Analytical function**

- using its apparatus, it receives signals from the external and internal environment of the organism, whose homeostasis it ensures, which it must evaluate
- it behaves like an information system, i.e. it has a certain range in which it can react
- it is not only the quality, but also the quantity of the signals, the space and time in which and for which it acts that decides
- since IS makes decisions based on the evaluation of several signals in a given space and time, its logic is not categorical, but Boolean (Leng G., Bertwich Z. 2002)
- the IS function is not based on strict specificity (Zinkernagel RM, 2002)

**Executive function**

it aims to preserve and restore disturbed homeostasis.

**It done by:**

- repair of damaged cells
- removing of damaged cells or foreign material in the process of **phagocytosis**, which is always accompanied by **inflammation**
- isolation of foreign material (e.g. formation of cysts)
- adaptation to a new environment (**symbiosis**).

**Fig. 3:** Man as a holobiont (A) and his immune system (B)