

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

**Analiza poziomu przeciwciał po zakażeniu
SARS-CoV-2 albo szczepieniu przeciwko COVID-19
w populacji wielkopolskiej w latach 2020-2022**

Dagny Lorent

Praca doktorska zrealizowana w Zakładzie Wirusologii Molekularnej

Promotor: dr hab. Luiza Handschuh, prof. ICHB PAN

Promotor pomocniczy: dr Paweł Zmora

Poznań 2024

Składam serdeczne podziękowania

Dr hab. Luizie Handschuh, prof. ICHB PAN
za kierownictwo naukowe, cenne uwagi merytoryczne i ogromną życzliwość;
Dr Pawłowi Zmorze,
za opiekę naukową oraz pomoc w realizacji i pisaniu niniejszej rozprawy;
oraz wszystkim osobom, które
przyczyniły się do powstania tej pracy.

Spis treści

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	1
2. Streszczenie.....	3
3. Summary	4
4. Wprowadzenie	5
4.1. Pandemia COVID-19.....	5
4.2. Ludzkie koronawirusy	6
4.2.1. Koronawirusy „przeziębieniowe” - HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 ...	6
4.2.2. SARS-CoV-1	7
4.2.3. MERS-CoV	7
4.3. SARS-CoV-2	8
4.3.1. Budowa	8
4.3.2. Cykl replikacyjny.....	11
4.3.3. Zmienność genetyczna	13
4.3.4. Transmisja oraz objawy zakażenia	14
4.3.5. Wykrywanie zakażenia.....	15
4.4. Odporność przeciwko SARS-CoV-2.....	17
4.5. Szczepionki przeciwko COVID-19.....	18
4.5.1. Program szczepień przeciwko COVID-19 w Polsce	20
5. Cel pracy	24
6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	25
6.1. Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.	25
6.2. The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.	28
6.3. Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.	31
6.4. Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.	33
7. Dyskusja.....	36
8. Podsumowanie i perspektywy	47
9. Wykaz skrótów	50
10. Bibliografia.....	52
11. Załączniki	61
11.1. Opinia komisji bioetycznej	61
11.2. Oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	63
11.3. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	68

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Lorent D***, Nowak R*, Roxo C, Lenartowicz E, Makarewicz A, Zaremba B, Nowak S, Kuszal Ł, Stefaniak J, Kierzek R, Zmora P.
Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.
Vaccines. 2021; 9(6):541.
IF₂₀₂₁ = 4,961; pkt MEiN = 140
2. **Lorent D**, Nowak R, Luwański D, Pisarska-Krawczyk M, Figlerowicz M, Zmora P.
The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.
Vaccines. 2022; 10(10):1576.
IF₂₀₂₂ = 7,8; pkt MEiN = 140
3. **Lorent D**, Nowak R, Jankowska M, Kuszal Ł, Zmora P.
Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.
Vaccines. 2023; 11(1):118.
IF₂₀₂₃ = 5,2; pkt MEiN = 140
4. **Lorent D**, Nowak R, Figlerowicz M, Handschuh L, Zmora P.
Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.
Vaccines. 2024; 12(5): 475.
IF₂₀₂₃ = 5,2; pkt MEiN = 140

Wykaz prac naukowych nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Szabat M, **Lorent D**, Czapik T, Tomaszewska M, Kierzek E, Kierzek R.
RNA secondary structure as a first step for rational design of the oligonucleotides towards inhibition of Influenza A Virus replication.
Pathogens. 2020; 9(11):925.
IF₂₀₂₀ = 3,492; pkt MEiN = 100
2. Baranek J, Banaszak M, Kaznowski A, **Lorent D**.
A novel *Bacillus thuringiensis* Cry9Ea-like protein with high insecticidal activity towards *Cydia pomonella* larvae.
Pest Management Science. 2021; 77(3):1401-1408.
IF₂₀₂₁ = 4,463; pkt MEiN = 140
3. Baranek J, Banaszak M, **Lorent D**, Kaznowski A, Konecka E.
Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2 and Vip3 toxin combinations in *Spodoptera exigua* control: highlights on synergism and data scoring.
Entomologia Generalis. 2021; 41(1):71-82.
IF₂₀₂₁ = 6,608; pkt MEiN = 70
4. Mirska B, Woźniak T, **Lorent D**, Ruszkowska A, Peterson JM, Moss WN, Mathews DH, Kierzek R, Kierzek E.
In vivo secondary structural analysis of Influenza A virus genomic RNA.
Cellular and Molecular Life Sciences. 2023; 80(5):136.
IF₂₀₂₃ = 6,2; pkt MEiN = 140

2. Streszczenie

Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2) wywołujący chorobę COVID-19 został zidentyfikowany po raz pierwszy w grudniu 2019 r. Od czasu rozpoczęcia pandemii COVID-19 w marcu 2020 r. podejmowano różne działania chroniące przed zakażeniem SARS-CoV-2, w tym niezwykle szybko opracowano i wprowadzono skuteczne szczepionki. Pomimo, że pandemia COVID-19 została uznana za zakończoną w maju 2023 r., stale mutujący SARS-CoV-2 nadal stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, a wiele aspektów odporności przeciwko temu wirusowi pozostaje nieznanymi.

Celem niniejszej pracy było zbadanie odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie przeciwko COVID-19. W badaniach określono poziom przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w populacji Poznania oraz Wielkopolski w różnych punktach czasowych w latach 2020–2022.

Wykazano, że seroprewalencja zakażeń SARS-CoV-2 w ogólnej populacji Poznania po pierwszej fali pandemii COVID-19 wyniosła 0,93%, a najbardziej narażone na zakażenie były osoby starsze, mające częsty kontakt z innymi ludźmi oraz niestosujące się do obostrzeń sanitarno-epidemiologicznych. Bezobjawowe zakażenie SARS-CoV-2 odnotowano u około 1/3 osób posiadających przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2. Następnie udowodniono, że poziom przeciwciał po zakażeniu SARS-CoV-2 koreluje z przebiegiem choroby i jest tym wyższy, im cięższy przebieg COVID-19. Analogicznie, u osób z cięższym przebiegiem choroby obserwowano wyższy poziom przeciwciał poszczepiennych niż u osób zaszczepionych, które wcześniej przeszły infekcję SARS-CoV-2 bezobjawowo. Stwierdzono również, że poziom przeciwciał wytworzonych w odpowiedzi na szczepionkę mRNA jest wyższy niż na szczepionkę wektorową, lecz ulega on szybszemu obniżeniu się. Miano przeciwciał wytworzonych po przyjęciu dwóch dawek szczepionki albo infekcji SARS-CoV-2 znacznie maleje w ciągu siedmiu miesięcy, u niektórych osób spadając nawet poniżej progu wykrywalności. Przyjęcie kolejnych dawek szczepionek zwiększa poziom przeciwciał. Niezależnie od miana przeciwciał, szczepienia zapewniły ochronę przed zakażeniem na przełomie dominacji wariantów alfa i delta. Z kolei po szczytowych falach zakażeń spowodowanych wariantami delta i omikron stwierdzono częstsze przypadki infekcji SARS-CoV-2, bez względu na liczbę przyjętych dawek szczepionki.

Wyniki analizy poziomu przeciwciał, przedstawione w niniejszej pracy, przyczyniły się do lepszego zrozumienia odpowiedzi odpornościowej po zakażeniu SARS-CoV-2 albo szczepieniu przeciwko COVID-19. Tym samym dostarczyły one informacji przydatnych dla opracowania strategii zapobiegania i kontroli zakażeń SARS-CoV-2, ze szczególnym uwzględnieniem polityki szczepień.

3. Summary

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causing the COVID-19 disease was first identified in December 2019. Since the beginning of the COVID-19 pandemic in March 2020, various measures have been taken to protect against SARS-CoV-2 infection, including the extremely rapid development and introduction of effective vaccines. Although the COVID-19 pandemic was declared over in May 2023, the constantly mutating SARS-CoV-2 still poses a serious threat to human health, and many aspects of immunity against this virus remain unknown.

This doctoral thesis aims to study the immune response to SARS-CoV-2 infection and/or vaccination against COVID-19. In this research, levels of antibodies against SARS-CoV-2 were determined in the population of Poznań and Greater Poland province at different time points in 2020-2022.

It was shown that the SARS-CoV-2 seroprevalence in the general population of Poznań after the first wave of the COVID-19 pandemic was 0.93%, and the most vulnerable to infection were the elderly, those in frequent contact with other people, and those who did not comply with epidemiological recommendations. Asymptomatic SARS-CoV-2 infection was reported in about one-third of those with antibodies against SARS-CoV-2. Subsequently, it was proven that the levels of antibodies after SARS-CoV-2 infection correlate with the course of the disease and are higher the more severe the course of COVID-19. Similarly, higher levels of postvaccination antibodies were observed in those with a more severe course of the disease than in vaccinated individuals who had previously undergone asymptomatic SARS-CoV-2 infection. It was also found that the level of antibodies produced in response to the mRNA vaccine is higher than that to the vector vaccine, but it declines more rapidly. The titer of antibodies produced after receiving two doses of the vaccine and/or having SARS-CoV-2 infection decreases significantly within seven months, in some cases even below the detection threshold. Receipt of subsequent vaccine doses increases antibody levels. Regardless of antibody titers, vaccination provided protection against new cases of infection during the displacement of the Alpha by the Delta variant. However, after peaks of the Delta and the Omicron variant waves, more frequent cases of SARS-CoV-2 infection were found, regardless of the number of vaccine doses received.

The results of the antibody levels analysis presented here contribute to a better understanding of the immune response after SARS-CoV-2 infection and/or COVID-19 vaccination. Thereby, they provide information of use for developing strategies for the prevention and control of SARS-CoV-2 infection, with a special focus on vaccination policies.

4. Wprowadzenie

4.1. Pandemia COVID-19

Nowy, dotychczas nieznaną wirus został zidentyfikowany po raz pierwszy w grudniu 2019 r. w Wuhan w Chinach u osób z objawami ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome*, SARS) o nieznaną etiologii [1]. W dniu 31 grudnia 2019 r. Miejska Komisja Zdrowia Wuhan przekazała do Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) informację o wystąpieniu sytuacji epidemicznej [2], a po kilku dniach został opublikowany pierwszy genom nowego wirusa uznanego za czynnik chorobotwórczy u pacjentów z Wuhan. Ze względu na genetyczne pokrewieństwo nowo zidentyfikowanego wirusa z innymi ludzkimi koronawirusami (ang. *human coronavirus*, HCoV), Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) nadał mu nazwę „drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego” (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) [3]. Następnie, w dniu 20 stycznia 2020 r. z powodu wzrostu liczby zakażeń SARS-CoV-2 w Chinach wdrożono surowe obostrzenia, m.in. kwarantanny domowe osób zakażonych i mających kontakt z chorymi oraz ograniczenia w przemieszczaniu się i udziale w zgromadzeniach publicznych [4]. Pomimo podjętych środków zapobiegawczych wirus nadal rozprzestrzenił się w populacji, co spowodowało, że 30 stycznia 2020 r. WHO ogłosiło stan zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym. Ze względu na dużą liczbę nowych zakażeń zgłaszanych w wielu innych krajach, w dniu 11 marca 2020 r. ogłoszono pandemię COVID-19 (ang. *coronavirus disease 2019*) [2].

Pierwszy przypadek zakażenia SARS-CoV-2 w Polsce został zidentyfikowany 4 marca 2020 r., a osiem dni później wprowadzono stan zagrożenia epidemicznego. Od 23 marca 2020 r. roku w Polsce obowiązywał stan epidemii COVID-19, który został odwołany 16 maja 2022 r. Ze względu na zmniejszenie liczby zakażeń SARS-CoV-2 i spowodowanych nimi hospitalizacji oraz zgonów 1 lipca 2023 r. zniesiono stan zagrożenia epidemicznego [5-8]. Łącznie od marca 2020 r. do lipca 2023 r. w Polsce potwierdzono ponad 6,5 mln zakażeń SARS-CoV-2 oraz prawie 120 tys. zgonów powiązanych z COVID-19 [9].

Głównie dzięki wprowadzeniu szczepień ochronnych przeciwko COVID-19, w dniu 5 maja 2023 r. WHO ogłosiło, że COVID-19 nie stanowi już zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym. Do tego czasu na świecie odnotowano ponad 765 mln przypadków zakażeń SARS-CoV-2 oraz prawie 7 mln spowodowanych nimi zgonów. Należy pamiętać, że m.in. ze względu na różne strategie diagnozowania oraz bezobjawowy przebieg zakażeń SARS-CoV-2 u niektórych osób, liczby te mogą być mocno niedoszacowane [9-13].

4.2. Ludzkie koronawirusy

Koronawirusy są najliczniejszą grupą rodziny *Coronaviridae* należącej do rzędu *Nidovirales*. Wszyscy przedstawiciele tego rzędu posiadają materiał genetyczny w postaci niesegmentowanego, jednoniciowego RNA o dodatniej polarności. Cechami wyróżniającymi koronawirusy są charakterystyczne białka powierzchniowe przypominające w obrazie mikroskopowym koronę słoneczną, którym zawdzięczają swoją nazwę, a także największe genomy wśród wirusowych genomów RNA, posiadające nawet 32 tys. nukleotydów. Biorąc pod uwagę pochodzenie ewolucyjne koronawirusy podzielono na cztery rodzaje: alfa, beta, gamma i delta. Postawą klasyfikacji była analiza filogenetyczna siedmiu kluczowych replikaz i białek pomocniczych koronawirusów. Alfa- i betakoronawirusy infekują niemal jedynie ssaki, podczas gdy gamma- i deltakoronawirusy, z kilkoma wyjątkami, mają swój rezerwuuar wśród ptaków [3, 14].

Do tej pory zidentyfikowano siedem koronawirusów zdolnych do infekowania ludzi: HCoV-229E i HCoV-NL63 należące do alfakoronawirusów, oraz HCoV-OC43, HCoV-HKU1, pierwszy koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 1*, SARS-CoV-1), koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego (ang. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*, MERS-CoV) oraz SARS-CoV-2, które z kolei należą do betakoronawirusów. Koronawirusy powodują zwykle łagodne infekcje układu oddechowego o objawach przeziębienia, przy czym trzy ludzkie betakoronawirusy: SARS-CoV-1, MERS-CoV i SARS-CoV-2, mogą wywoływać epidemie chorób o cięższym przebiegu i wyższej śmiertelności [3, 14, 15].

4.2.1. Koronawirusy „przeziębieniowe” - HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1

Najdłużej znane HCoV „przeziębieniowe”, HCoV-229E oraz HCoV-OC43 zostały wyizolowane w latach 60. XX w. od pacjentów z infekcją górnych dróg oddechowych. Dwa pozostałe HCoV zostały odkryte dopiero po ponad 40 latach, w wyniku badań zapoczątkowanych pojawieniem się SARS-CoV-1. W 2004 r. z górnych dróg oddechowych pacjenta o łagodnym nasileniu objawów wyizolowano HCoV-NL63, podczas gdy zidentyfikowany rok później HCoV-HKU1 pochodził od osoby z zapaleniem płuc. Istnieje hipoteza głosząca, że HCoV-229E oraz HCoV-NL63 mogły wyewoluować od koronawirusów nietoperzy. HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 oraz HCoV-HKU1 występują na całym świecie i są odpowiedzialne za 10-30% wszystkich infekcji górnych dróg oddechowych, w większości o łagodnym, samoograniczającym się przebiegu przypominającym przeziębienie. Ponowne infekcje tymi HCoV występują powszechnie, co wskazuje, że infekcja często nie wywołuje długotrwałej ochrony [14].

4.2.2. SARS-CoV-1

SARS-CoV-1 został po raz pierwszy zidentyfikowany w listopadzie 2002 r. w Chinach. Wywołana przez SARS-CoV-1 choroba, SARS, szybko osiągnęła rozmiary epidemii, a do końca 2003 r. liczba potwierdzonych laboratoryjnie zakażeń sięgnęła ponad 8 tys. przypadków, ze wskaźnikiem śmiertelności wynoszącym 9,6% [16]. Po 2004 r., w którym zanotowano pojedyncze przypadki zachorowania na SARS, nie zgłoszono żadnych nowych zakażeń SARS-CoV-1. Objawami SARS są wysoka gorączka, kaszel, bóle mięśni i zmęczenie, którym w większości towarzyszą zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Niewydolność oddechowa, postępująca przeważnie u osób w wieku powyżej 50 lat i chorujących przewlekłe, często przybierała ostry przebieg i prowadziła do zgonu [17]. Dotychczas nie zatwierdzono żadnego leku na SARS, a metaanaliza skuteczności terapeutyków stosowanych przy innych infekcjach wirusowych do zwalczania SARS-CoV-1 wykazała brak korzystnego działania na pacjentów [18]. Transmisję wirusa udało się skutecznie ograniczyć w krótkim czasie poprzez monitorowanie kontaktów z osobami zakażonymi SARS-CoV-1 i wprowadzenie kwarantanny, a także utrzymanie dystansu społecznego poprzez zamknięcie szkół i miejsc pracy [17]. Kilka lat po zakończeniu epidemii odkryto, że gospodarzami wielu koronawirusów podobnych do SARS-CoV-1 są nietoperze, przy czym niektóre z nich nie wymagają gospodarza pośredniego do zakażenia człowieka [19]. SARS była pierwszą groźną i łatwo przenoszącą się nową chorobą, która pojawiła się w XXI wieku [20].

4.2.3. MERS-CoV

W przeciwieństwie do epidemii SARS, epidemia bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej (ang. *Middle East Respiratory Syndrome*, MERS) nie została opanowana od kwietnia 2012 r., kiedy to po raz pierwszy stwierdzono zakażenie MERS-CoV u człowieka. MERS-CoV został wyizolowany z wielbłądów Półwyspu Arabskiego, Afryki i części Azji [21], a obecność przeciwciał przeciwko MERS-CoV stwierdzono w próbkach surowicy krwi wielbłądów pochodzących z wczesnych lat 80. XX w [22]. Analizy ewolucyjne sugerują, że MERS-CoV pochodzi od występujących u nietoperzy koronawirusów, które zostały przeniesione na wielbłądy, a z nich na człowieka [23]. Powody, dla których zakażenie MERS-CoV wśród ludzi wystąpiło dopiero w XXI w. głównie na terenie Arabii Saudyjskiej, gdzie zaobserwowano 84% wszystkich zakażeń i 39% spowodowanych nimi zgonów, pozostają nieznane [24]. Spektrum objawów MERS obejmuje wysoką gorączkę, kaszel, problemy z oddychaniem i biegunkę, a w przypadku ciężkiego przebiegu choroby może dojść do niewydolności wielonarządowej i w konsekwencji zgonu [25]. Pomimo prawie 3-krotnie mniejszej liczby zakażeń MERS-CoV w porównaniu do SARS-CoV-1, wynoszącej niewiele więcej niż 2,6 tys., do kwietnia 2024 r. aż 36% z nich skończyło się zgonem [24]. Profilaktyka zakażeń MERS-CoV polega na przestrzeganiu dobrych nawyków higieny osobistej,

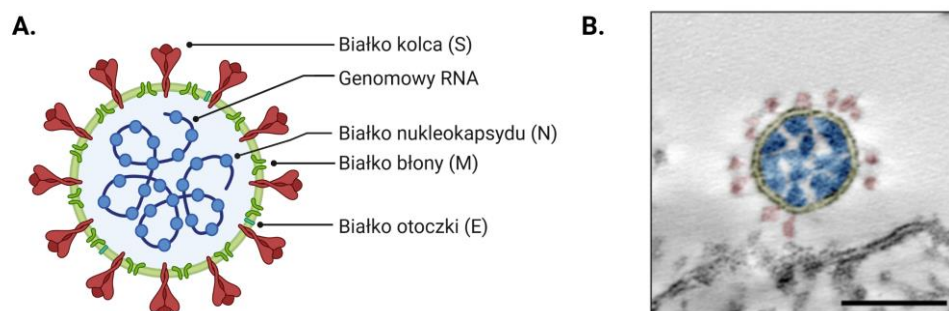
szczególnie w pracy z wielbłędami i w placówkach opieki zdrowotnej oraz unikaniu spożywania surowych produktów pochodzenia zwierzęcego [26]. Podobnie jak w przypadku SARS-CoV-1, nadal nie zatwierdzono leku na MERS, a leki stosowane przy innych chorobach wirusowych nie przynosiły poprawy stanu pacjentów zakażonych MERS-CoV [25, 27].

4.3. SARS-CoV-2

W 2019 r. w Chinach pojawił się nowy koronawirus podobny do SARS-CoV-1, który ze względu na filogenetyczne pokrewieństwo z SARS-CoV-1 został nazwany SARS-CoV-2 i zaliczony jest do podrodzaju *Sarbecovirus* (ang. *SARS-Betacoronavirus*) [3]. SARS-CoV-2 niezwykle szybko rozprzestrzenił się po całym świecie, adaptując się do infekcji człowieka, powodując największą i najpoważniejszą pandemię od czasu pandemii grypy hiszpanki z 1918 r. Pochodzenie SARS-CoV-2 wciąż nie zostało ustalone. Pomimo bardzo dużego podobieństwa SARS-CoV-2 do koronawirusów izolowanych z nietoperzy [28] oraz mniejszego do tych pochodzących z łuskowców [29], nie jest jasne czy koronawirusy zwierzęce są przodkami pandemicznego koronawirusa, ani czy ich gospodarze pełnią rolę rezerwuaru SARS-CoV-2 [15, 30, 31].

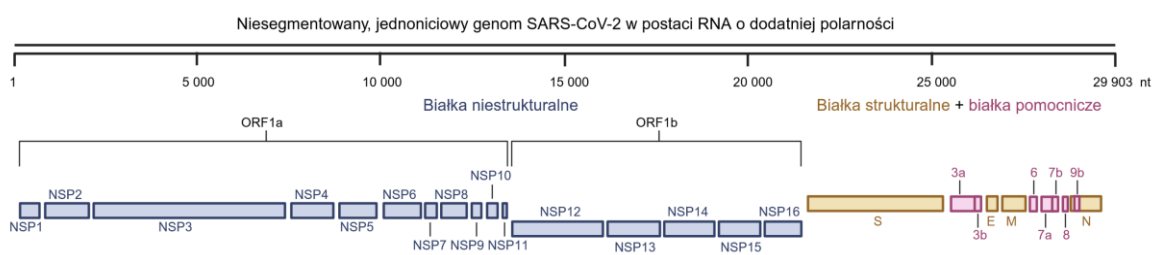
4.3.1. Budowa

Kulisty wirion SARS-CoV-2 składa się z jednoniciowego genomowego RNA związanego z białkiem nukleokapsydu (ang. *nucleocapsid*, N) i zamkniętego w kapsydie zbudowanym z białek błony (ang. *membrane*, M), otoczki (ang. *envelope*, E) i kolca (ang. *spike*, S) zakotwiczonych w osłonce (Rycina 1A) [14]. Trimery białka S wyraźnie wystają z otoczki, a helikalny nukleokapsyd składający się z genomu SARS-CoV-2 i białka N tworzy gęsty rdzeń widoczny pod mikroskopem elektronowym (Rycina 1B) [32].



Rycina 1. Wirion SARS-CoV-2. **A.** Schematyczne przedstawienie wirionu SARS-CoV-2. **B.** Zdjęcie wirionu SARS-CoV-2 spod transmisyjnego mikroskopu elektronowego, kolorowane. Pasek skali odpowiada 100 nm. Żółtym kolorem oznaczono osłonkę lipidową, czerwonym trimer białka kolca (S), a niebieskim genomowy RNA otoczony białkiem nukleokapsydu (N). Kapsyd budują również białka błony (M) oraz otoczki (E). **A.** przygotowano na podstawie [14], zaadoptowano z “SARS-CoV-2 (COVID-19 virus)”, BioRender.com (2024). Źródło [33]. **B.** pochodzi z [32].

Genom SARS-CoV-2 ma blisko 30 tys. pz i zawiera 14 otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frame*, ORF). Ze względu na fakt, że genom SARS-CoV-2 ma postać jednonicowego RNA o dodatniej polarności, zawierającego na końcu 5' czapeczkę, a na końcu 3' ogon poliA, może on ulegać translacji bezpośrednio po wnikięciu do komórki gospodarza. Około dwie trzecie końca 5' genomu SARS-CoV-2 koduje policistronową replikazę (polimerazę RNA zależną od RNA), zawierającą dwie nakładające się na siebie ramki odczytu ORF1a oraz ORF1b. Powstające na ich matrycy dwie poliproteiny są trawione przez dwie proteazy wirusowe do 16 białek niestrukuralnych (ang. *non-structural protein*, NSP), niezbędnych do replikacji i transkrypcji SARS-CoV-2. Cztery ORF na końcu 3' genomu wirusowego kodują zestaw białek strukturalnych: N, S, M i E, które budują kapsyd i są odpowiedzialne m.in. za składanie i uwalnianie wirusów potomnych z komórki. Pomędzy genami kodującymi białka strukturalne znajdują się dodatkowe geny kodujące białka pomocnicze, zaangażowane w regulację infekcji wirusowej (Rycina 2) [14, 34].



Rycina 2. Genom SARS-CoV-2. ORF - otwarta ramka odczytu, NSP - białko niestrukuralne, S - białko kolca, E - białko otoczki, M - białko błony, N - białko nukleokapsydu. Przygotowano na podstawie [14] z użyciem BioRender.com.

Ze względu na tematykę niniejszej pracy doktorskiej opis budowy białek strukturalnych SARS-CoV-2 zostanie ograniczony do białek S i N.

Białko S wystaje z otoczki wirusa w formie trimerów, nadając SARS-CoV-2 charakterystyczny kształt przypominający koronę. Białko S odgrywa ważne role w infekcyjności, zakresie gospodarzy i patogenezie, pośrednicząc we wnikaniu SARS-CoV-2 do komórek gospodarza. Białko S SARS-CoV-2, podobnie jak białka S SARS-CoV-1 oraz HCoV-NL63, wiąże ludzki enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. *human angiotensin-converting enzyme 2*, hACE2). Warunkiem koniecznym do fuzji błony wirusowej z błoną komórki gospodarza jest proteolityczna aktywacja białka S, zachodząca przez jego przecięcie przez proteazy komórkowe. Może się ona odbywać za pośrednictwem transbłonowej proteazy serynowej typu 2 (ang. *type II transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2) lub endosomalnych proteaz cysteinowych takich jak katepsyna L lub katepsyna B [35]. Wybór sposobu wnikania wirusa do komórki zależy od dostępności proteaz, która może różnić się

w zależności od typu komórek [36] oraz sekwencji białka S [37]. Sugeruje się także, że SARS-CoV-2 może wykorzystywać alternatywne receptory dla hACE2 (np. neuropilinę 1) [38] jak i angażować inne proteazy do proteolitycznej aktywacji (np. należące do rodziny adamalizyn) [37].

W budowie białka S, złożonego z 1273 reszt aminokwasowych, na podstawie cięcia przez proteazy komórkowe można wyróżnić dwie podjednostki: S1 oraz S2. Podjednostki S1 tworzą „głowę” trimery, podczas gdy podjednostki S2 stanowią jego rdzeń i kotwiczą trimer w błonie [39, 40]. Podjednostka S1 składa się z sekwencji sygnałowej poprzedzającej domenę N-końcową (ang. *N-terminal domain*, NTD) oraz domenę C-końcową (ang. *C-terminal domain*, CTD), która zawiera domenę wiążącą receptor (ang. *receptor binding domain*, RBD). Podjednostka S2, zaczynając od końca N, jest zbudowana kolejno z peptydu fuzyjnego (ang. *fusion peptide*, FP), dwóch sekwencji powtórzeń heptapeptydu 1 i 2 (ang. *heptad repeat 1*, HR1 i ang. *heptad repeat 2*, HR2) otaczających centralną helisę (ang. *central helix*, CH) oraz domenę łącznikową (ang. *connector domain*, CD), domeny transbłonowej (ang. *transmembrane domain*, TM) oraz ogona cytoplazmatycznego (ang. *cytoplasmic tail*, CT). Białko S jest rozcinane przez proteazy komórkowe gospodarza najpierw na styku podjednostek S1 oraz S2, a następnie w miejscu S2' sąsiadującym z FP. SARS-CoV-2 różni się od SARS-CoV-1 występowaniem wielozasadowego miejsca cięcia specyficznego dla furyny (ang. *furin cleavage site*, FCS) na styku podjednostek S1 oraz S2. FCS o innych sekwencjach aminokwasowych są za to obecne u pozostałych ludzkich betakoronawirusów [39].

Białko S ulega dynamicznym zmianom podczas wnikania i infekcji. W stanie prefuzyjnym białko S może przyjmować dwie różne konformacje, przechodząc między konformacją „zamkniętą” ze wszystkimi trzema domenami RBD leżącymi płasko na powierzchni trimery S uniemożliwiający związanie receptora, a konformacją „otwartą”, w której jedna lub więcej domen RBD unosi się, odsłaniając miejsce wiązania receptora [40]. Po związaniu receptora następuje przejście z formy prefuzyjnej do formy postfuzyjnej, w wyniku której podjednostka S1 prawdopodobnie oddysocjuje od podjednostki S2. Dalsze zmiany konformacyjne zachodzące w podjednostce S2 obejmują jej wydłużenie i ekspozycję FP, umożliwiając zbliżenie i fuzję błon SARS-CoV-2 i gospodarza [35].

Mutacje w obrębie białka S mogą wpływać na jego strukturę, a tym samym zmieniać m.in. siłę wiązania z komórkowymi receptorami albo zdolność rozpoznawania poszczególnych epitopów przez przeciwciała gospodarza, będącą podstawą unikania odpowiedzi immunologicznej przez patogeny [41], dlatego są głównym obiektem badań molekularnych i epidemiologicznych. Białko S podlega ewolucji adaptacyjnej, wykazując wiele miejsc pozytywnej selekcji. Analiza mutacji w obrębie sekwencji kodującej białko S na podstawie wszystkich sekwencji SARS-CoV-2 zdeponowanych w bazie National Center

for Biotechnology Information (NCBI) Virus do 14 kwietnia 2023 r. wykazała, że mutacje występowały w 1252 z 1273 pozycji aminokwasowych. Liczba mutacji wahała się od jednej do 55 na sekwencję białka S, z maksymalnie 14 różnymi rodzajami mutacji w każdej pozycji. Mutacje występujące w ponad 40% sekwencji stwierdzono w dwóch pozycjach domeny NTD (reszty aminokwasowe 19 i 142), czterech pozycjach domeny RBD (reszty aminokwasowe 452, 478, 484 i 501), dwóch pozycjach domeny CTD podjednostki S1 (reszty aminokwasowe 614 i 655), jednej pozycji FCS (reszta aminokwasowa 681) oraz jednej pozycji HR1 (reszta aminokwasowa 969) [42].

Podobnie jak w przypadku innych HCoV, białko S jest głównym celem opracowywanych leków i szczepionek [43-45]. Spośród różnych etapów cyklu replikacyjnego SARS-CoV-2, etap wnikania jest jednym z najbardziej atrakcyjnych celów terapeutycznych nie tylko ze względu na inicjację infekcji, ale również dlatego, że receptory komórkowe i białka zaangażowane we wnikanie wirusa są dostępne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

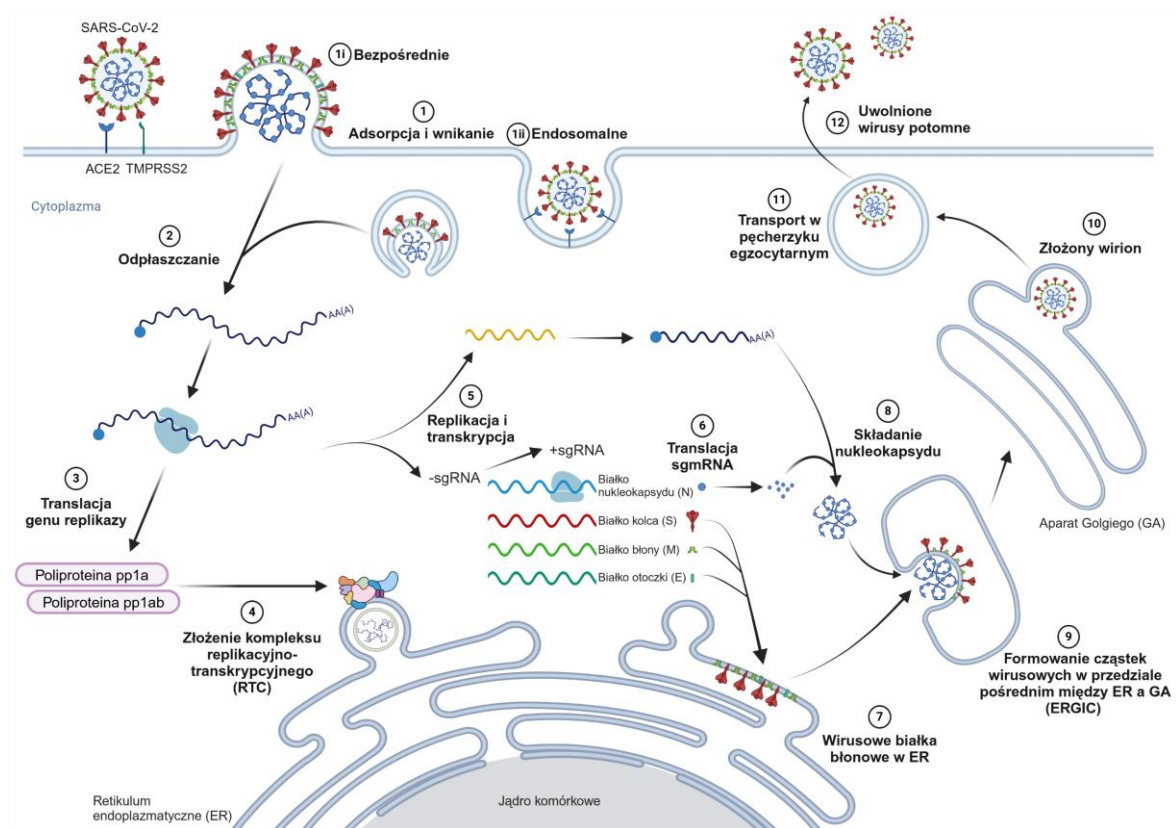
Najważniejszą rolą białka N jest łączenie się z genomowym RNA i tworzenie wirusowego kompleksu rybonukleoproteinowego (ang. *viral ribonucleoprotein complex*, vRNP), który pośredniczy w pakowaniu RNA do wirionów poprzez słabo poznane interakcje między białkami N i M. Białko N jest włączane do kompleksu RTC na wczesnych etapach infekcji, co przypuszczalnie ułatwia syntezę i translację wirusowego RNA poprzez rekrutację czynników translacyjnych gospodarza i promowanie zmiany matrycy RNA. Istnieją dowody sugerujące, że oprócz wspierania replikacji wirusowego RNA białko N uczestniczy w supresji odpowiedzi odpornościowej gospodarza.

Białko N składa się z 419 aminokwasów. W jego budowie można wyróżnić dwie domeny występujące na końcach N i C, otoczone trzema regionami wewnątrznie nieuporządkowanymi (ang. *intrinsically disordered regions*, IDRs). Uważa się, że domena NTD pośredniczy w specyficznej interakcji z sygnałem pakowania genomu wirusowego, a domena CTD tworzy zwarty dimer, który prawdopodobnie pomaga w formowaniu vRNP. Region IDR łączący NTD z CTD posiada fragment bogaty w serynę oraz argininę, który jest fosforylowany w zakażonych komórkach. Regiony IDRs na końcach N i C są mniej konserwatywne [46, 47].

4.3.2. Cykl replikacyjny

Cykl replikacyjny SARS-CoV-2 rozpoczyna się od adsorpcji, czyli związania się białka S z receptorem na powierzchni komórki gospodarza, którym preferencyjnie jest białko hACE2. Następnie w zależności od miejsca proteolitycznej aktywacji białka S (opisanej w powyższym paragrafie) (i) wirus wnika do wnętrza komórki bezpośrednio poprzez fuzję błony komórkowej oraz błon wirusowych lub (ii) dochodzi do endocytozy, po czym na skutek

działania katepsyn oraz zakwaszenia środowiska endosomu do fuzji błon endosomu oraz wirusa i uwolnienia materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy [35]. Następnie, z wykorzystaniem rybosomów gospodarza zachodzi translacja genu replikazy i z dwóch poliprotein, pp1a oraz pp1ab, powstaje 16 NSP formujących kompleks replikacji i transkrypcji (ang. *replication-transcription complex*, RTC), który inicjuje namnażanie się wirusowego RNA. Oprócz syntezy genomowego RNA, w procesie nieciągłej syntezy RNA powstają subgenomowe RNA (ang. *subgenomic RNA*, sgRNA) o ujemnej polarności (-sgRNA). -sgRNA są transkrybowane do sgRNA o dodatniej polarności (+sgRNA) i przekształcane w mRNA (sgmRNA). W oparciu o sgmRNA w błonie retikulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) syntezowane są strukturalne i pomocnicze białka SARS-CoV-2. Powstałe białka wirusowe oraz genomowy RNA łączą się następnie w wiriony potomne w przedziale pośrednim pomiędzy ER a aparatem Golgiego (ang. *Golgi apparatus*, GA) (ang. *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*, ERCIG). Złożone cząstki wirusowe trafiają ostatecznie do GA, skąd są uwalniane z zainfekowanej komórki na drodze egzocytozy (Rycina 3) [14].



Rycina 3. Cykl replikacyjny SARS-CoV-2. Opis w tekście. Przygotowano na podstawie [14], zaadaptowano z "Coronavirus Replication Cycle", BioRender.com (2024). Źródło [33].

4.3.3. Zmienność genetyczna

Podobnie jak większość wirusów RNA, SARS-CoV-2 ewoluuje z czasem. Mutacje i rekombinacje w genomie SARS-CoV-2 prowadzą do powstania nowych wariantów mogących różnić się transmisją, wywoływanymi objawami i przebiegiem choroby, a także odpowiedzią na leczenie czy szczepienie [48]. SARS-CoV-2 zidentyfikowany w Wuhan w grudniu 2019 r. został uznany za wirus typu dzikiego. W celu nadania priorytetu globalnemu monitorowaniu i badaniom kolejnych powstających wariantów SARS-CoV-2, WHO opracowało trzystopniowy system oceny ryzyka dla zdrowia publicznego. Nowy wariant trafia pod obserwację WHO, jeżeli obecne w nim zmiany genetyczne budzą podejrzenia w kwestii ich wpływu na właściwości i zwiększoną transmisję w porównaniu do aktualnie krążących wariantów SARS-CoV-2. Gdy przewidywania się potwierdzają, a nowo powstały wariant wirusa zaczyna dominować oraz cechuje się m.in. zwiększoną zdolnością do przenoszenia się, unikaniem odpowiedzi immunologicznej czy zmienioną wrażliwością na leczenie i detekcję, zyskuje on status wariantu budzącego zainteresowanie (ang. *variant of interest*, VOI). Wariant ten staje się wariantem alarmowym (ang. *variant of concern*, VOC) w momencie, gdy dodatkowo spełni co najmniej jedno z trzech kryteriów: 1) zmiany objawów klinicznych związanych z cięższym przebiegiem zakażenia; 2) zmiany w epidemiologii choroby znacząco wpływającej na zdolność systemów opieki zdrowotnej do zapewnienia opieki pacjentom z COVID-19 lub innymi chorobami, a tym samym wymagającej poważnych interwencji w zakresie zdrowia publicznego; 3) znaczącego spadku skuteczności dostępnych szczepionek w ochronie przed ciężką chorobą. Do nazewnictwa wariantów SARS-CoV-2 wykorzystuje się greckie litery. Początkowo, od maja 2021 r. przypisywano je każdemu nowemu VOI. System nazewnictwa został zmieniony w marcu 2023 r. i obecnie greckie litery są zarezerwowane jedynie dla oznaczania VOC [49].

Dodatkowo, w celu ujednoczenia nazewnictwa dziesiątek tysięcy zsekwencjonowanych genomów SARS-CoV-2 zaproponowano system nazewnictwa Pangolin (ang. *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINeages*). Opiera się on wyłącznie na analizie filogenetycznej. Zgodnie z nomenklaturą Pangolin, każdej linii przypisuje się literę lub kombinację liter, po której następują liczby (np. B.1.1.7). Klasyfikacja ta ułatwia śledzenie najpowszechniejszych i najszybciej rozprzestrzeniających się linii SARS-CoV-2, a także zrozumienie wzorów i czynników warunkujących globalną transmisję SARS-CoV-2 [50].

Prawie rok od dominacji typu dzikiego SARS-CoV-2 na świecie pojawiły się kolejno cztery VOC: alfa (linia B.1.1.7, zidentyfikowany po raz pierwszy w Wielkiej Brytanii), beta (linia B.1.351, zidentyfikowany po raz pierwszy w Południowej Afryce), gamma (linia P.1, zidentyfikowany po raz pierwszy w Brazylii), oraz delta (linia B.1.617.2, zidentyfikowany po raz pierwszy w Indiach). W przeciwieństwie do innych VOC, dominujący obecnie piąty VOC omikron (linia B.1.1.529), który został wykryty po raz pierwszy w listopadzie 2021 r.

w Południowej Afryce, ewoluował z niezwykle różnorodnością i jest podzielony na pięć głównych linii (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 i BA.5), z wieloma podliniami, w ramach których pojawiły się dalsze zmiany antygenowe [48].

Wszystkie VOC wyróżniają się zwiększoną liczbą mutacji niesynonimicznych oraz odmiennymi właściwościami fenotypowymi, w tym zmienioną zdolnością do transmisji i immunogennością [48]. Najwięcej mutacji stwierdzono w VOC omikron, który cechuje zmiana ponad 50 reszt aminokwasowych w porównaniu do szczepu typu dzikiego, przy czym ponad połowa z nich występuje w białku S. Wraz z rozwojem pandemii pojawiały się i zanikały kolejne mutacje, dając początek nowym VOC. Niektóre ze zmian aminokwasowych są unikalne dla określonych VOC, podczas gdy inne mutacje, w tym reszt aminokwasowych 417, 484, 501 i 681 białka S, były obecne w większości VOC, a mutacja zmieniająca pozycję 614 białka S występuje we wszystkich VOC [51]. Przykładowo, najbardziej powszechna zamiana kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 614 białka S indukuje zmianę konformacyjną w białku S, które staje się bardziej „otwarte”, zwiększa się jego powinowactwo wiązania i interakcja z hACE2. Co więcej, mutacja ta jest związana z wyższą zakaźnością i stosunkowo niższą śmiertelnością, co prowadzi do jej pozytywnej selekcji [52].

Do kwietnia 2024 r. głównymi VOC występującymi w Polsce w porządku chronologicznym były: alfa (okres dominacji od lutego 2021 r. do czerwca 2021 r.), delta (okres dominacji od lipca 2021 r. do grudnia 2021 r.), omikron BA.1 (okres dominacji od stycznia 2022 r. do lutego 2022 r.), BA.2 (okres dominacji od marca 2022 r. do czerwca 2022 r.), BA.5 (okres dominacji od lipca 2022 r. do grudnia 2022 r.), BQ.1 (okres dominacji od stycznia 2023 r. do lutego 2023 r.), XBB.1.5 (okres dominacji od marca 2023 r. do czerwca 2023 r.), CH.1.1 (okres dominacji lipiec 2023 r.), EG.5.1 (okres dominacji od sierpnia 2023 r. do grudnia 2023 r.), oraz BA.2.86, który dominuje w Polsce od stycznia 2024 r. [53].

4.3.4. Transmisja oraz objawy zakażenia

Do zakażenia SARS-CoV-2 może dojść na skutek bezpośredniego bliskiego kontaktu z zakażoną osobą poprzez wdychanie kropelek z dróg oddechowych zawierających wirusa, w tym aerozoli wytwarzanych podczas kichania, kaszlu, mówienia, śpiewania lub oddychania, a także poprzez przebywanie w zatłoczonych i słabo wentylowanych pomieszczeniach, w których znajduje się osoba zakażona. Rozprzestrzenianie się SARS-CoV-2 możliwe jest również w wyniku dotykania oczu, nosa lub ust po dotknięciu powierzchni skażonych wirusem [54, 55]. Wyższe ryzyko zakażenia SARS-CoV-2, wiążące się z nadmierną ekspozycją na wirusa oraz niedostateczną ochroną, szczególnie na początku pandemii COVID-19, przed wprowadzeniem szczepień ochronnych, dotyczyło zwłaszcza osób pracujących w sektorze ochrony zdrowia oraz narażonych na częste kontakty społeczne i korzystających z transportu publicznego, a także o niższym statusie socjoekonomicznym, mężczyzn, starszych

i chorujących przewlekłe [56]. Zwiększone ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 stwierdzono szczególnie wśród osób pracujących w zawodach pielęgniarki, lekarza, opiekuna medycznego oraz nauczyciela [57]. Jednakże faktyczny wpływ środowiska pracy na szerzenie się zakażeń SARS-CoV-2 jest dyskusyjny [58, 59]. Należy pamiętać, że na ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 składa się wiele czynników, m.in. dostępność i stosowanie środków ochrony osobistej [60, 61], odpowiednie przeszkolenie, implementacja i przestrzeganie procedur w opiece nad pacjentem zakaźnym [61], lokalne ogniska SARS-CoV-2, możliwość przenoszenia wirusa poprzez kontakty domowe [56, 59] czy wdrażanie obostrzeń i kwarantanny w odpowiedzi na zwiększoną liczbę zakażeń SARS-CoV-2 [61].

Ograniczenie rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 zależy w dużej mierze od możliwości wykrywania i izolacji osób zakażonych koronawirusem. Zakażenie SARS-CoV-2 charakteryzuje się brakiem specyficznych objawów, a sam przebieg infekcji może przyjąć charakter od bezobjawowego do ciężkiego, a w najgorszych przypadkach może prowadzić do zgonu. Do najczęstszych objawów należą objawy grypopodobne takie jak gorączka, kaszel i złe samopoczucie. W przypadku ciężkiego przebiegu charakterystycznym objawem jest duszność. Nierzadko występują też zmęczenie, bóle głowy i mięśni, katar, nudności, wymioty oraz biegunka [62, 63]. Przed pojawieniem się wariantu omikron (opisanego powyżej), utrata smaku oraz węchu były również często związane z COVID-19 [64]. Szeroki zakres powikłań może prowadzić do ciężkiej choroby obejmującej m.in. zapalenie płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej, uszkodzenie wątroby, niewydolność serca, zakrzepicę, choroby nerek, choroby neurologiczne i sepsę [62]. Większe prawdopodobieństwo ciężkiego przebiegu COVID-19, związanej z nim hospitalizacji i zgonu stwierdzono u osób starszych i chorujących przewlekłe [65-67]. Podczas gdy większość osób, które zachorowały na COVID-19 w pełni wraca do zdrowia, co najmniej 10% osób doświadcza utrzymujących się powyżej trzech miesięcy skutków zakażenia SARS-CoV-2 określanych jako tzw. long COVID. Jest to choroba wielosystemowa, manifestująca się głównie zmęczeniem, dusznością i zaburzeniem funkcji poznawczych, obejmująca długotrwałe występowanie objawów towarzyszących zakażeniu SARS-CoV-2 albo pojawienie się nowych jednostek chorobowych. Przyczyny, następstwa, metody leczenia i czynniki ryzyka wystąpienia long COVID są niejasne i stanowią temat ciągłych badań [68-70].

4.3.5. Wykrywanie zakażenia

Do określenia występowania SARS-CoV-2 oraz dynamiki sytuacji epidemiologicznej służą różne strategie testowania. W celu identyfikacji obecnego zakażenia SARS-CoV-2 wykorzystywane są metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych, wykrywające RNA wirusa, lub testy antygenowe, wykrywające obecność specyficznych białek wirusowych u badanych osób. Najwyższą czułością i specyficznością cechuje się łańcuchowa reakcja

polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription - polymerase chain reaction*, RT-PCR), która wykrywa RNA wirusa i pozostaje złotym standardem w diagnostyce SARS-CoV-2. Zaletami testów antygenowych są prostota wykonania i szybkość uzyskania wyniku, jednak cechuje je zwykle niższa czułość i specyficzność niż testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych, a zatem są użyteczne w węższym przedziale czasowym infekcji SARS-CoV-2 [71, 72]. Metodą uzupełniającą detekcję aktywnych przypadków zakażeń SARS-CoV-2 na poziomie populacji jest nadzór środowiskowy, np. badający występowanie SARS-CoV-2 w ściekach, jednak nie jest on rutynowo i powszechnie wykorzystywany do śledzenia przebiegu pandemii COVID-19 [73, 74]. Ze względu na nierówny dostęp do diagnostyki, priorytetowe testowanie osób wykazujących objawy infekcji SARS-CoV-2 [75, 76], spadek miana wirusa w trakcie infekcji poniżej poziomu wykrywalności [77], a także dostępność testów antygenowych w aptekach i możliwość ich samodzielnego wykonania bez raportowania pozytywnego wyniku organom nadzoru epidemiologicznego [78], liczba przypadków zakażeń SARS-CoV-2, a w szczególności tych o charakterze bezobjawowym, może być niedoszacowana. Uzyskane dane nie pozwalają więc wnioskować o faktycznej odporności populacji. W celu uzyskania pełnego obrazu pandemii COVID-19 kluczowe jest określenie seroprewalencji, czyli występowania w populacji specyficznych przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2, świadczących o kontakcie z wirusem. Do rutynowo stosowanych testów serologicznych, które wykrywają obecność przeciwciał wytwarzanych przeciwko określonym antygenom SARS-CoV-2 we krwi badanej osoby należą testy immunoenzymatyczne (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), chemiluminescencyjne (ang. *chemiluminescence immunoassay*, CLIA) oraz immunoblot. Najbardziej czasochłonne i wymagające laboratorium trzeciej klasy bezpieczeństwa biologicznego (ang. *biosafety level 3*, BSL-3) ze względu na konieczność pracy z aktywnym SARS-CoV-2 są testy neutralizacji (ang. *neutralization assay*, NA) oraz testy immunofluorescencji (ang. *immunofluorescence assay*, IFA) [79, 80]. Badania występowania przeciwciał umożliwiają zrozumienie dynamiki infekcji w podgrupach, takich jak osoby w różnym wieku lub płci, a także doprecyzowanie wskaźnika śmiertelności z powodu infekcji SARS-CoV-2. Ponadto, rozciągnięcie badań w czasie, polegające na powtarzaniu testów na obecność przeciwciał w różnych punktach czasowych, pozwala ocenić ryzyko transmisji SARS-CoV-2 w danej populacji i zidentyfikować czynniki sprzyjające zakażeniu, jednocześnie informując o spadku odporności po zakażeniu SARS-CoV-2 albo szczepieniu. Wyzwaniem w przeprowadzeniu analiz seroprewalencji jest pozyskanie reprezentatywnej próby osób oraz systematyczny udział ochotników, a także koszt badań [81]. Pomimo, że ich wyniki są często raportowane z opóźnieniem w porównaniu do badań aktywnych (diagnozowanych na bieżąco) przypadków zakażeń SARS-CoV-2, połączenie danych uzyskanych z różnych źródeł ma ogromne znaczenie dla monitorowania rzeczywistej

skali pandemii COVID-19 oraz odporności populacyjnej, zasadniczych parametrów branżych pod uwagę przy podejmowaniu decyzji dotyczących zdrowia publicznego.

4.4. Odporność przeciwko SARS-CoV-2

Odpowiedź organizmu ludzkiego na zakażenie SARS-CoV-2 obejmuje wrodzone (nieswoiste) i nabyte (swoiste) mechanizmy obronne układu odpornościowego. Pierwszą linię obrony stanowią szybkie nieswoiste mechanizmy, których główną rolą jest rozpoznanie i ograniczenie ekspresji wirusa. W odpowiedzi na wniknięcie SARS-CoV-2 wydzielane są prozapalne chemokiny i cytokiny, wytwarzane między innymi przez monocyty, makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne. Uwalnianie cytokin stymuluje również komórki NK (ang. *natural killer*) zdolne do spontanicznego zabijania zakażonych wirusem komórek. Odpowiedź przeciwwirusowa jest wzmacniana przez ekspresję interferonów typu I skutkującą m.in. powstaniem stanu przeciwwirusowego i produkcją genów stymulowanych interferonem. Ponadto, stymuluje ona dojrzewanie komórek dendrytycznych, monocytów i makrofagów w komórki prezentujące antygen, współdziałające z cząsteczkami kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) klasy II. Mechanizmy obronne uruchomione przez odpowiedź wrodzoną inicjują specyficzną dla SARS-CoV-2 odpowiedź nabytą. Polega ona na proliferacji swoistych limfocytów B i T, do której dochodzi, gdy receptory powierzchniowe tych komórek wiążą się z antygenami wirusowymi. Wchodzące w skład odpowiedzi typu komórkowego cytotoksyczne limfocyty T (ang. *cytotoxic T cells*, Tc) prowadzą do eliminacji zakażonych komórek, podczas gdy pomocnicze limfocyty T (ang. *T helper cells*, Th) wspomagają odpowiedź immunologiczną [82]. Wykazano, że dominującymi celami limfocytów T po zakażeniu SARS-CoV-2 są białka strukturalne (S, M i N). Limfocyty T są także często skierowane na inne białka SARS-CoV-2 takie jak ORF3, ORF8, NSP3, NSP4 i NSP12 [83]. Pobudzenie ze strony limfocytów Th pozwala limfocytom B na zapoczątkowanie odpowiedzi typu humoralnego, w wyniku której powstają specyficzne przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2, rozpoznające głównie białka S i N. Związanie przez przeciwciała cząsteczek wirusowych, jak i komórek zakażonych SARS-CoV-2 prezentujących na swojej powierzchni antygeny wirusowe, prowadzi do ich eliminacji. W przeważającej większości przeciwciała neutralizują SARS-CoV-2 poprzez blokowanie wiązania białka S z receptorem hACE2 i zakłócanie kolejnych etapów fuzji z błoną komórki gospodarza. Chociaż wszystkie domeny białka S są podatne na wiązanie przeciwciał, celem przeciwciał neutralizujących jest przede wszystkim domena RBD, a następnie domena NTD. Najslabsze właściwości neutralizujące zaobserwowano dla przeciwciał wiążących domenę S2, ale co ciekawe, niektóre z nich wykazują szeroką aktywność wobec wielu członków podrodzaju *Sarbecovirus*.

Podobnie jak w przypadku innych infekcji dróg oddechowych, zakażenie SARS-CoV-2 stymuluje produkcję przeciwciał klas IgM, IgG oraz IgA. Są one wykrywalne w surowicy już

po tygodniu od wystąpienia objawów, a pomiędzy drugim a czwartym tygodniem ich poziom osiąga plateau. Chociaż stężenie przeciwciał w surowicy spada z czasem, mogą być one wykrywalne przez miesiące, przy czym przeciwciała klasy IgG są najliczniejsze i bardziej stabilne niż przeciwciała klas IgM i IgA [84, 85]. Oprócz wytworzenia przeciwciał, dla długotrwałej ochrony przeciwko SARS-CoV-2 ważne jest również powstanie specyficznych limfocytów pamięci B i T, które prowadzą do przyspieszonej i bardziej efektywnej odpowiedzi immunologicznej przy ponownym kontakcie z antygenem.

Odporność przeciwko SARS-CoV-2 może być wykształcona w odpowiedzi na infekcję wirusem lub szczepienie [82]. Uważa się, że niemal wszystkie rutynowo stosowane szczepionki zapewniają ochronę głównie poprzez indukcję przeciwciał [86]. W przeciwieństwie do infekcji SARS-CoV-2, która może powodować powstanie przeciwciał nakierowanych na różne białka wirusa, we wszystkich szczepionkach przeciwko SARS-CoV-2 dopuszczonych obecnie do obrotu na terenie Unii Europejskiej (UE), jedynym antygenem jest białko S. W związku z tym na skutek szczepienia produkowane są wyłącznie przeciwciała przeciwko białku S. Na poziom ochrony zapewnianej poprzez zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie wpływa wiele czynników genetycznych i środowiskowych, w tym wiek, płeć, obecność chorób współistniejących, wcześniejsza ekspozycja na antygen i jego dawka [84, 87-93]. Chociaż większości z tych czynników nie można zmodyfikować, w celu opanowania transmisji SARS-CoV-2 i zaplanowania programu szczepień ważne jest określenie poziomu i czasu utrzymywania się przeciwciał indukowanych przez zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie przeciwko COVID-19. Jednocześnie, biorąc pod uwagę, że pojawiają się różne VOC z wieloma mutacjami w obrębie sekwencji kodującej białko S, które mogą skutkować zmniejszonym powinowactwem do przeciwciał, ważne jest również zbadanie, czy i w jakim stopniu ochrona wytworzona w następstwie wcześniejszego zakażenia albo szczepienia jest zmniejszona wobec nowych wariantów SARS-CoV-2.

4.5. Szczepionki przeciwko COVID-19

Przed rozpoczęciem pandemii COVID-19 czas pomiędzy opracowaniem szczepionki a jej dopuszczeniem do obrotu i wprowadzeniem na rynek zajmował zazwyczaj od 10 do 15 lat. Długość tego procesu wynikała z wielu następujących po sobie etapów określonych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) oraz Europejską Agencję Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA). Etapy te obejmują kolejno badania podstawowe i przedkliniczne, badania kliniczne I, II, i III fazy, procedury weryfikacyjne, rejestrację, masową produkcję, kontrolę jakości i długoterminowe badania porejestracyjne. Biorąc pod uwagę skalę i szybkość rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 szybko stało się jasne, że standardowe tempo powstawania szczepionek jest zbyt długie, aby opanować pandemię COVID-19. Przyspieszenie procesu opracowania szczepionek

przeciwko COVID-19 pozwoliło na zatwierdzenie pierwszych szczepionek w niecały rok po opublikowaniu sekwencji genomowej SARS-CoV-2, co nastąpiło w styczniu 2020 r. Do czynników, które wpłynęły na znacznie szybsze powstanie szczepionek w czasie pandemii COVID-19 należą m.in. ekstrapolacja danych z badań przedklinicznych kandydatów na szczepionki przeciwko SARS oraz MERS jak również doświadczeń uzyskanych z badań klinicznych szczepionek opartych na różnych platformach (w tym mRNA i adenowirusowych), równoległe prowadzenie różnych faz badań klinicznych, a także masowa produkcja szczepionek przed ich dopuszczeniem do obrotu, optymalizacja procesu zatwierdzania przez organy regulacyjne, współpraca różnych jednostek w celu wymiany informacji naukowych oraz znaczne dofinansowanie badań [94-96].

Do końca 2022 r. WHO zatwierdziło dziewięć szczepionek przeciwko COVID-19 opartych o cztery platformy technologiczne:

- szczepionki oparte na mRNA: BNT162b2 (Pfizer—BioNTech) [97] oraz mRNA-1273 (Moderna) [98]
- szczepionki wykorzystujące wektory adenowirusowe niezdolne do replikacji: Ad26.COV2.S (Janssen) [99], Ad5-nCoV (CanSino) [100] oraz ChAdOx1 (AstraZeneca) [101]
- szczepionki podjednostkowe: NVX-CoV2373 (Novavax) [102]
- szczepionki inaktywowane: BBIBP-CorV (Sinopharm) [103], BBV152 (Bharat Biotech) [103] oraz firmy Sinovac sprzedawaną pod nazwą handlową CoronaVac [104].

W przypadku szczepionek opartych o mRNA i wektory wirusowe, do komórki gospodarza dostarczany jest kwas nukleinowy, odpowiednio mRNA lub DNA, na podstawie którego powstaje białko S SARS-CoV-2 wywołujące specyficzną odpowiedź immunologiczną. Gotowe antygeny podawane są natomiast w szczepionkach podjednostkowych, w postaci rekombinowanego białka S SARS-CoV-2, oraz w szczepionkach inaktywowanych, które zawierają całego wirusa. Pierwotny schemat uodporniania zakładał przyjęcie dwóch dawek szczepionek. Wyjątkami były jednodawkowe szczepionki Ad26.COV2.S oraz Ad5-nCoV.

Na dokładniejsze omówienie zasługują szczepionki produkowane przez firmy Pfizer—BioNTech oraz AstraZeneca, gdyż zostały one zatwierdzone w największej liczbie państw, tj. w 149 krajach. Szczepionka BNT162b2 zawiera mRNA, w której wszystkie urydyny zastąpiono N1-metylopseudourydyną w celu zwiększenia stabilności. Ponadto zmieniona została również sekwencja antygeny, poprzez dwa podstawienia proliny w podjednostce S2 białka S SARS-CoV-2 typu dzikiego, skutkujące stabilizacją konformacji prefuzyjnej białka S. Nośnikiem wykorzystanym w szczepionce BNT162b2 są nanocząsteczki lipidowe. Szczepionka ChAdOx1 zawiera natomiast sekwencję DNA kodującą białko S identyczne ze szczepem typu dzikiego SARS-CoV-2, która jest dostarczana w niezdolnym do replikacji wektorze adenowirusowym szympansa. Obie szczepionki są podawane domięśniowo,

przy czym rekomendowany odstęp pomiędzy dawkami szczepionki BNT162b2 wynosi trzy tygodnie, a ChAdOx1 od czterech do 12 tygodni. Szczepionka ChAdOx1 jest bardziej dogodna w użyciu, ze względu na wyższą temperaturę przechowywania (od +2°C do +8°C) i niższy koszt jednej dawki (od 4 do 6 \$, z wyjątkiem UE, gdzie jej koszt wynosił 2,15 \$) dlatego też była częściej stosowana w uboższych krajach. Dla porównania, szczepionka BNT162b2 musi być długoterminowo przechowywana w temperaturze od -80°C do -60°, a cena jednej dawki wynosi od 6,75 do 12\$, z wyjątkiem UE i USA, gdzie dawka kosztuje 19,5\$.

Jednym z kluczowych aspektów oceny szczepionek jest wywołany przez nie efekt ochronny. Według wyników badań klinicznych III fazy, największą efektywnością cechowały się szczepionki mRNA (ponad 91,3%). W przypadku pozostałych szczepionek, ochrona przed ciężkim przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2 wahała się od 66,7% do 81,5% dla szczepionek wektorowych dwudawkowych, od 66,1% do 68,83% dla szczepionek wektorowych jednodawkowych, od 86,3% do 93,2% dla szczepionek podjednostkowych oraz od 50,65% do 83,5% dla szczepionek inaktywowanych. Jednakże rzeczywista efektywność szczepionek różniła się od obserwowanej w badaniach klinicznych ze względu na zmiany schematów szczepienia, w tym okresu pomiędzy dawkami, użycie różnych typów preparatów u tej samej osoby, badaną populację i jej stopień narażenia na SARS-CoV-2, słabnięcie odporności z czasem, a także pojawianie się nowych VOC [105-107]. W celu podtrzymania ochronnego efektu szczepień, WHO rekomendowała kolejne dawki szczepionek, szczególnie dla osób o zwiększonym ryzyku zakażenia SARS-CoV-2, takich jak pracownicy medyczni, osoby starsze czy chorujące przewlekle [108]. Zważywszy na dynamiczną sytuację epidemiologiczną i fakt, że pierwsze szczepionki zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencję SARS-CoV-2 typu dzikiego, szczepionki mRNA zostały zaktualizowane o sekwencję antygenu dla podwariantów omikron BA.1 lub BA.4-5. Oprócz szczepionek biwalentnych, firmy Novavax, Pfizer—BioNTech oraz Moderna opracowały monowalentne szczepionki oparte o podwariant omikron XBB.1.5 [109-111]. W czerwcu 2024 r. na liście szczepionek wymienionych przez WHO do użytku w nagłych wypadkach znalazły się szczepionki BNT162b2, mRNA-1273, Ad26.COV2.S, Ad5-nCoV, NVX-CoV2373, CoronaVac, BBIBP-CorV oraz podjednostkowa szczepionka BECOV-2 firmy Biological E. Limited [112].

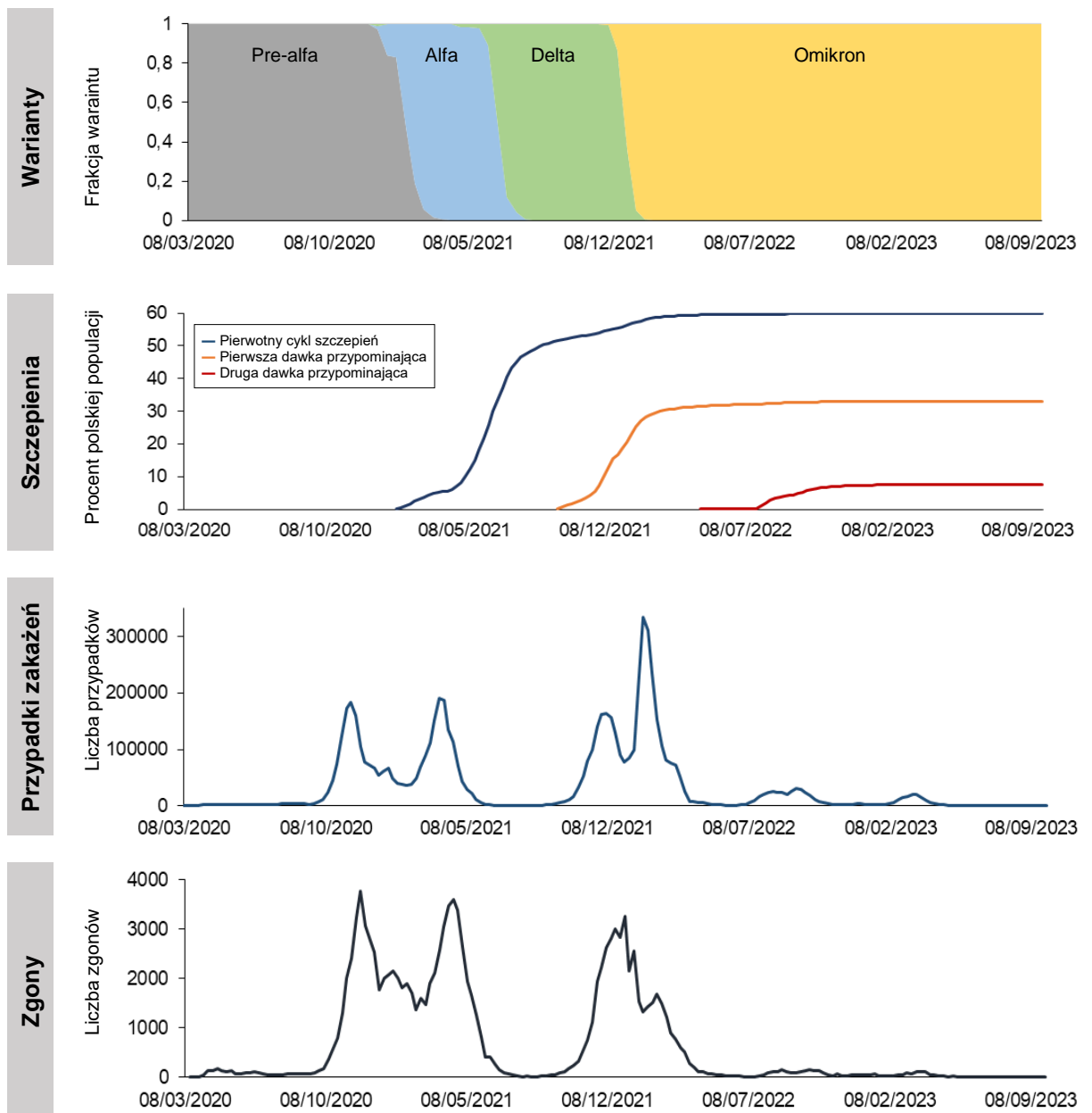
4.5.1. Program szczepień przeciwko COVID-19 w Polsce

Szczepienia przeciwko COVID-19 w Polsce rozpoczęły się 27 grudnia 2020 r., sześć dni po dopuszczeniu do obrotu w UE pierwszej szczepionki przeciwko COVID-19 BNT162b2 [110, 113]. Do kolejnych szczepionek przeciwko COVID-19, które po zatwierdzeniu przez UE pojawiły się w Polsce należą mRNA-1273 (decyzja z 06.01.2021 r.) [109], ChAdOx1 (decyzja z 29.01.2021 r.) [114], Ad26.COV2.S (decyzja z 11.03.2021 r.) [115] oraz NVX-CoV2373 (decyzja z 20.12.2021 r.) [111]. Zgodnie z Narodowym Programem Szczepień, strategia

immunizacji w Polsce została podzielona na cztery etapy. Na samym początku, w tzw. etapie 0, szczepionki były podawane pracownikom sektora ochrony zdrowia, opieki społecznej i studentom kierunków medycznych. Kolejny etap obejmował szczepienia osób powyżej 60 lat, chorujących przewlekle, pensjonariuszy placówek opieki długoterminowej oraz pracowników służb mundurowych i nauczycieli. Następnie szczepionki były oferowane osobom poniżej 60 roku życia chorującym przewlekle oraz przedstawicielom zawodów narażonym na zakażenie SARS-CoV-2 z powodu częstych kontaktów społecznych, a na końcu wszystkim osobom dorosłym w kolejności od najstarszych. Różne szczepionki przeciwko COVID-19 były dedykowane określonym grupom priorytetowym, a schemat ich podawania był dostosowywany do aktualnej sytuacji epidemiologicznej. Przykładowo, szczepionki BNT162b2 były podawane pracownikom służby zdrowia, natomiast nauczyciele otrzymywali szczepionki ChAdOx1. W celu częściowej immunizacji jak największej liczby osób, w marcu 2021 r. wydłużono czas pomiędzy podaniem pierwszej a drugiej dawki wyżej wymienionych szczepionek, w przypadku szczepionki BNT162b2 z 21 dni do 42 dni, a szczepionki ChAdOx1 z czterech do 12 tygodni. Ponadto, szczepionki przeciwko COVID-19 podawano najwcześniej trzy miesiące od potwierdzonego zakażenia SARS-CoV-2. W maju 2021 r. skrócono czas, jaki musiał upłynąć od podania pierwszej dawki aby otrzymać kolejną dawkę szczepionki, tj. do 35 dni w przypadku szczepionek BNT162b2 oraz ChAdOx1, oraz odstęp czasowy pomiędzy zakażeniem SARS-CoV-2 a szczepieniem, tj. do 30 dni. W tym samym czasie rozpoczęto także szczepienia osób niepełnoletnich, najpierw w przedziale wiekowym od 16 a 18 lat, w czerwcu 2021 r. nastolatków od 12 do 15 roku życia, a w grudniu 2021 r. dzieci w wieku od 5 do 11 lat. W związku z doniesieniami sugerującymi możliwość spadku odporności po szczepieniu i pojawieniem się nowego VOC omikron, po zakończeniu pierwotnego cyklu szczepień (dwoma dawkami szczepionek przeciwko COVID-19 z wyjątkiem jednodawkowej szczepionki Ad26.COV2.S), pracownikom sektora ochrony zdrowia zaoferowano kolejną dawkę szczepionki we wrześniu 2021 r., dwa miesiące wcześniej niż pozostałym pełnoletnim mieszkańcom Polski (trzecią lub drugą dawkę w przypadku pierwotnej immunizacji Ad26.COV2.S). Niezależnie od typu przyjętej wcześniej szczepionki jako kolejne dawki podawano jedynie szczepionki mRNA: BNT162b2 lub mRNA-1273. Przyjęcie następnej dawki przypominającej (czwartej lub trzeciej w przypadku pierwotnej immunizacji Ad26.COV2.S) było możliwe w kwietniu 2022 r. dla osób starszych powyżej 80 roku życia, następnie pracowników sektora ochrony zdrowia w sierpniu 2022 r., a dla osób powyżej 12 roku życia miesiąc później. Zaktualizowane szczepionki wydane przez Pfizer—BioNTech i Moderna, zawierające RNA kodujące nie tylko białko S szczepu dzikiego SARS-CoV-2, ale również podwariantu omikron BA.1 lub dwóch podwariantów omikron BA.4 i omikron BA.5, były dostępne jako dawki przypominające w Polsce po ich zatwierdzeniu przez UE od września 2022 r. W kwietniu 2023 r. z dodatkowej dawki szczepionki (piątej lub czwartej w przypadku pierwotnej immunizacji

Ad26.CO2.S) mogły skorzystać osoby powyżej 60 roku życia, o upośledzonej odporności oraz pracujące w podmiotach medycznych. Szczepionka NVX-CoV2373 oparta o podwariant omikron XBB.1.5. była dostępna w Polsce po ponad miesiącu od zatwierdzenia przez UE w październiku 2023 r. [5-7, 109-111, 116, 117].

Ze szczepień przeciwko COVID-19 w Polsce skorzystała ponad połowa społeczeństwa [117, 118]. W 2021 r. pierwotny cykl szczepień (dwoma dawkami szczepionek przeciwko COVID-19 z wyjątkiem jednodawkowej szczepionki Ad26.CO2.S) ukończyło 55,8% mieszkańców Polski, a w kolejnym roku odsetek ten niewiele wzrósł do 60% i nie zmienił się do października 2023 r. Mniejszą popularnością cieszyła się kolejna dawka szczepionki (trzecia lub druga dawka w przypadku pierwotnej immunizacji Ad26.CO2.S), którą w 2021 r. przyjęło 18,4% osób, rok później 33% osób, po czym w okresie do października 2023 r. zainteresowanie dodatkowym szczepieniem znacznie spadło i zanotowano wzrost o jedynie 0,1 p. proc. W porównaniu do 2022 r. następną dawkę szczepionki (czwartą lub trzecią dawkę w przypadku pierwotnej immunizacji Ad26.CO2.S) przyjęło tylko niecałe 8% społeczeństwa (7,3% w 2022 r. oraz 7,7% do października 2023 r.) [117, 118] (Rycina 4). Szczepienia przeciwko COVID-19 w Polsce były bezpłatne i nieobowiązkowe, z wyjątkiem osób wykonujących zawody medyczne i studentów medycyny, którzy musieli ukończyć pierwotny cykl szczepień do lutego 2021 r. [5]. Obserwowane w Polsce niskie wskaźniki wyszczepienia, szczególnie kolejnymi dawkami szczepionek przeciwko COVID-19, wskazują na ogromny problem odbioru społecznego przekazów dotyczących szczepień, konieczność walki z dezinformacją, a także podejmowania dalszych działań popularyzujących bezpieczeństwo i korzystny efekt szczepień [119-122].



Rycina 4. Dominujące warianty SARS-CoV-2, przebieg szczepień przeciwko COVID-19, liczba zakażeń SARS-CoV-2 oraz powiązanych z nimi zgonów od 8 marca 2020 r. do 31 października 2023 r. w Polsce. Pierwotny cykl szczepień oznacza przyjęcie dwóch dawek szczepionki przeciwko COVID-19 z wyjątkiem jednodawkowej szczepionki Ad26.COV2.S (Janssen), a dawki przypominające oznaczają przyjęte kolejno dodatkowe dawki szczepionki. Wykres przygotowany na podstawie [9, 53, 117, 118].

5. Cel pracy

Pojawienie się SARS-CoV-2 w 2019 r. i szybki wzrost liczby zachorowań na wywoływaną przez niego chorobę COVID-19 doprowadziły do wybuchu pandemii COVID-19, stanowiącej ogromne wyzwanie gospodarcze i zdrowotne. Opublikowanie genomu SARS-CoV-2 w styczniu 2020 r. umożliwiło szybkie opracowanie zarówno testów wykrywających nowego koronawirusa, jak i szczepionek. Jednakże już na początku pandemii COVID-19 okazało się, że dostępne powszechne strategie testowania aktywnych przypadków zakażeń SARS-CoV-2 pomijają osoby skąpo- i bezobjawowe, również biorące udział w transmisji nowego koronawirusa. Ponadto, uzyskane wyniki badań epidemiologicznych nie dostarczały informacji o odporności populacji.

Mając na uwadze, że wiele aspektów związanych z odpornością na zakażenie SARS-CoV-2 i czasem jej trwania pozostaje niewyjaśnionych, szczególnie w obliczu nowo powstających VOC, głównym celem przedstawionego cyklu prac naukowych było poznanie odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie przeciwko COVID-19. Zostało to osiągnięte przez realizację następujących zadań szczegółowych:

- zbadanie seroprewalencji zakażeń SARS-CoV-2 w populacji Wielkopolski w latach 2020-2022 oraz identyfikację czynników ryzyka zakażenia SARS-CoV-2;
- określenie poziomu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w czasie po zakażeniu SARS-CoV-2 albo po szczepieniach przeciwko COVID-19;
- identyfikację czynników wpływających na poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2.

6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

6.1. Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.

Lorent D*, Nowak R*, Roxo C, Lenartowicz E, Makarewicz A, Zaremba B, Nowak S, Kuszel Ł, Stefaniak J, Kierzek R, Zmora P.

Vaccines. 2021; 9(6):541.

Pierwszy przypadek zakażenia SARS-CoV-2 w Polsce wykryto w marcu 2020 r. Do czerwca 2020 r. na świecie stwierdzono ponad 10,1 mln przypadków zakażeń SARS-CoV-2 i ponad 0,5 mln spowodowanych nimi zgonów, z czego w Polsce odnotowano ponad 33,7 tys. przypadków zakażeń SARS-CoV-2 potwierdzonych za pomocą RT-PCR i prawie 1,5 tys. powiązanych z nimi zgonów [9]. Jednakże skala zakażeń SARS-CoV-2 mogła być wysoce niedoszacowana, chociażby ze względu na bezobjawowy przebieg zakażenia koronawirusem u części osób oraz stosunkowo niską liczbą wykonanych testów diagnostycznych w kierunku COVID-19 [5, 123, 124]. Oszacowanie rzeczywistej liczby osób mającej kontakt z SARS-CoV-2 umożliwiają natomiast testy serologiczne, które wykrywają obecność przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 [79, 81]. Celem badań było: (i) oszacowanie częstości występowania przeciwciał klasy IgG oraz IgA przeciwko SARS-CoV-2 wśród mieszkańców Poznania i okolic po pierwszej fali pandemii COVID-19, (ii) określenie czynników ryzyka związanych z zakażeniem SARS-CoV-2.

Reprezentatywna grupa badawcza składała się z 1500 wybranych losowo ochotników z grupy 15 000 osób, które dobrowolnie zgłosiło chęć udziału w badaniu poprzez wypełnienie szeroko reklamowanej ankiety on-line w lipcu 2020 r. Badania przeprowadzono w okresie od lipca do września 2020 r. Kobiety stanowiły 59,73% uczestników, a mężczyźni 41,27%. Średni wiek badanych ochotników wynosił $38,7 \pm 12,7$ lat. Grupy osób zatrudnionych w miejscach wymagającym częstych kontaktów społecznych oraz wykonujących zawód bez częstego kontaktu z ludźmi były równo reprezentowane (odpowiednio 49,93% i 50,07%). Ponad 1/3 badanych (35,73%) cierpiała na choroby przewlekłe. W ciągu ostatnich dziewięciu miesięcy przed przystąpieniem do badania, u 82,67% uczestników wystąpiły objawy grypopodobne głównie o średnim (48%) i łagodnym (30,27%) nasileniu. Test na obecność SARS-CoV-2 został w trakcie wystąpienia objawów wykonany u 23,73% osób. Wśród nich tylko u 1,97% potwierdzono zakażenie SARS-CoV-2, co przełożyło się na 0,47% osób w grupie badawczej, które wiedziały, że przebyły zakażenie SARS-CoV-2. Niemal 6-krotnie więcej uczestników badania zadeklarowało natomiast kontakt z osobą zakażoną SARS-CoV-2 (2,67%), podczas gdy większość badanych ochotników (72,33%) nie była w stanie wskazać takiej sytuacji. Prawie wszyscy uczestnicy badania (96,93%) przestrzegali zaleceń

epidemiologicznych, w tym 2/3 osób (63,53%) nie podróżowało za granicę w ciągu ostatnich dziewięciu miesięcy. Kryteriami wykluczającymi udział w badaniu były: wiek poniżej 18 lat oraz występowanie objawów grypopodobnych w momencie pobierania materiału do badań.

Na podstawie wyników półilościowych testów ELISA wykonanych pomiędzy lipcem a sierpniem 2020 r. odnotowano wyższą częstość występowania przeciwciał klasy IgA (4%) niż klasy IgG (1,67%) przeciwko białku S SARS-CoV-2 wśród uczestników badania. Jednak w żadnym przypadku nie zaobserwowano serokonwersji przeciwciał klasy IgA w IgG, w związku z czym osoby, u których wykryto jedynie przeciwciała klasy IgA uznano za seronegatywne w kierunku SARS-CoV-2. Obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko zarówno białku S jak i N SARS-CoV-2 została potwierdzona za pomocą ilościowego testu immunoblot w niewiele więcej niż połowie przypadków, prowadząc do zmniejszenia odsetka osób seropozytywnych do 0,93%. Wśród uczestników poprzednio diagnozowanych w kierunku SARS-CoV-2, przeciwciała wykryto u mniej niż połowy badanych (42,86%) z potwierdzonym poprzednio zakażeniem SARS-CoV-2. U osób, u których wcześniej wykluczono zakażenie SARS-CoV-2, obecność przeciwciał stwierdzono u 1,72% uczestników. Co ciekawe, nie wykryto przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 u żadnego uczestnika deklarującego ciężki przebieg objawów grypopodobnych w ciągu ostatnich dziewięciu miesięcy. Ponad 1/3 osób posiadających przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2 (35,71%) nie wiedziała o wcześniejszym zakażeniu ze względu na jego bezobjawowy charakter.

Nie zaobserwowano znaczących różnic seroprewalencji ze względu na czas pobierania prób ani płeć uczestników. Wyższy odsetek osób posiadających przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2 stwierdzono w grupach osób: (i) powyżej 65 lat; (ii) wykonujących zawód obejmujący częsty kontakt z ludźmi; (iii) nie przestrzegających zaleceń epidemiologicznych oraz podróżujących za granicę w ciągu ostatnich dziewięciu miesięcy; (iv) mających kontakt z osobą zakażoną SARS-CoV-2. Fałszywie dodatnie wyniki testu ELISA stwierdzono głównie wśród uczestników w wieku od 18 do 33 lat, a także u osób z przewlekłymi chorobami układu autoimmunologicznego i oddechowego.

Podsumowując, niska seroprewalencja grupy badanej (0,93%) wskazuje na małą liczbę zakażeń SARS-CoV-2 w pierwszej fali pandemii COVID-19, która mogła wynikać m.in. ze wczesnego skutecznego wdrożenia obostrzeń sanitarno-epidemiologicznych i środków zaradczych. Przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2 wykryto zwłaszcza wśród osób nieprzestrzegających zaleceń epidemiologicznych, mających styczność z osobą zakażoną SARS-CoV-2 oraz wykonujących zawód wymagający częstego kontaktu z ludźmi. Ponadto wykazano, że osoby w wieku powyżej 65 lat również stanowią grupę szczególnie podatną na zakażenie SARS-CoV-2. Co więcej, stwierdzono, iż wyniki pierwszych dostępnych komercyjnie testów ELISA powinny być potwierdzane za pomocą metody immunoblot, co pozwoli na wykluczenie niespecyficznego i krzyżowego reaktywności przeciwciał. Ze względu

na fałszywie pozytywne wyniki półilościowego testu ELISA wykrywającego obecność przeciwciał klasy IgA przeciwko SARS-CoV-2 we wszystkich badanych próbach, w dalszych badaniach wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej sprawdzano tylko obecność przeciwciał klasy IgG.

6.2. The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.

Lorent D, Nowak R, Luwański D, Pisarska-Krawczyk M, Figlerowicz M, Zmora P. *Vaccines*. 2022; 10(10):1576.

Punktem wyjścia dla długookresowych badań poziomu przeciwciał anti-SARS-CoV-2 u pracowników medycznych były wyniki uzyskane w poprzedniej publikacji [125] oraz doniesienia literaturowe wskazujące na większe ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 u osób wykonujących zawód wymagający częstych kontaktów społecznych, a także mających bezpośrednią styczność z osobami zakażonymi SARS-CoV-2, takich jak pracownicy ochrony zdrowia [126, 127]. Ze względu na ich główną rolę w walce przeciwko pandemii COVID-19, pracownikom medycznym w Polsce w pierwszej kolejności zaoferowano szczepienie przeciwko COVID-19. Do tego celu zastosowano dwie dawki preparatu BNT162b2 z trzytygodniowym odstępem pomiędzy dawkami [116]. W badanym okresie, tj. od września 2020 r. do września 2021 r. liczba potwierdzonych zakażeń SARS-CoV-2 na świecie wzrosła z ponad 26,7 mln do ponad 231,4 mln, przy czym w Polsce odnotowano wzrost z ponad 70 tys. do więcej niż 2,9 mln zakażeń SARS-CoV-2. Globalna liczba zgonów spowodowanych COVID-19 wzrosła z ponad 876,6 tys. do więcej niż 4,74 mln, natomiast w Polsce stwierdzono wzrost z ponad 2 tys. do prawie 76 tys. zgonów powiązanych z COVID-19 [9].

Niniejsza praca miała na celu (i) określenie częstości zakażeń SARS-CoV-2 wśród personelu medycznego o różnym stopniu ekspozycji na SARS-CoV-2, w dwóch punktach czasowych przed wprowadzeniem szczepień (we wrześniu 2020 r. i grudniu 2020 r.) oraz dwukrotnie po przyjęciu obu dawek szczepionki przeciwko COVID-19 (w lutym 2021 r. i wrześniu 2021 r.); (ii) określenie poziomu przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 po zakażeniu SARS-CoV-2 i szczepieniu oraz (iii) identyfikację czynników wpływających na poziom przeciwciał.

Uczestnikami badania byli pracownicy dwóch jednostek medycznych z Wielkopolski: Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (ang. *Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Karol Jonscher's Clinical Hospital, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, DIDaCN*) oraz Oddziału Położniczo-Ginekologicznego Szpitala Powiatowego we Wrześni (ang. *Gynecology and Obstetrics Ward, District Hospital, Wrzesnia, GaOW*). Jednostki te zostały wybrane ze względu na podobny rozmiar (liczbę łóżek szpitalnych i liczbę pacjentów) oraz liczbę personelu, ale różny stopień narażenia na COVID-19. GaOW przyjął jedynie trzech pacjentów z dodatnim wynikiem testu w kierunku SARS-CoV-2 w 2020 r., podczas gdy w tym samym czasie w DIDaCN przyjęto 292 pacjentów z rozpoznaniem COVID-19 i ponad 8-krotnie więcej osób (2443) podejrzanych

o zakażenie SARS-CoV-2. Na podstawie częstości kontaktu z pacjentami z COVID-19, GaOW został zaklasyfikowany jako środowisko niskiego ryzyka zakażenia SARS-CoV-2, podczas gdy DIDaCN jako środowisko wysokiego ryzyka zakażenia SARS-CoV-2.

Grupa badawcza składała się z 90 osób i obejmowała 50 pracowników DIDaCN oraz 40 pracowników GaOW. Wszyscy uczestnicy stawali się regularnie na badania krwi, z wyjątkiem ostatniego punktu czasowego, w którym do pobrania krwi zgłosiło się mniej osób (41 z DIDaCN oraz 34 z GaOW). Większość badanych stanowiły kobiety (80% w DIDaCN i 87,5% w GaOW), co jest wynikiem nierównego udziału płci w strukturze zatrudnienia personelu medycznego. Średni wiek uczestników z DIDaCN wynosił $36,5 \pm 10,8$ lat. Połowa osób z DIDaCN pracowała jako pielęgniarki, prawie 1/3 była lekarzami (32%), a 18% wykonywało inny zawód medyczny. Pracownicy medyczni GaOW mieli średnio $53 \pm 10,6$ lat. Prawie 3/4 badanych z GaOW było położnymi i pielęgniarkami (72,5%), 15% pracowało jako lekarze, a 12,5% należało do innych pracowników medycznych.

W momencie rekrutacji do badania we wrześniu 2020 r. żaden z uczestników nie zadeklarował faktu zakażenia SARS-CoV-2 potwierdzonego testem, co jest zgodne z negatywnymi wynikami testów serologicznych przeprowadzonymi w pierwszym punkcie czasowym. W grudniu 2020 r. ogólna seroprewalencja zakażeń SARS-CoV-2 potwierdzona za pomocą ilościowego testu immunoblot wśród pracowników medycznych wzrosła z 0% do 37,8%. Niemal 1/5 uczestników (18,18%), u których wykryto przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 nie wykazywała wcześniej żadnych objawów świadczących o zakażeniu, podczas gdy u 9,1% ciężki przebieg COVID-19 wymagał hospitalizacji. Co ciekawe, odnotowano ponad dwukrotnie wyższy odsetek wyników dodatnich u pracowników medycznych z GaOW (52,5%), niż z DIDaCN (26%). W kolejnym punkcie czasowym, w lutym 2021 r., ogólna częstość występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 wynosiła 26% i w ciągu kolejnych siedmiu miesięcy zmalała do 17,1%. Warto zaznaczyć, że obecność przeciwciał wynikających z zakażenia SARS-CoV-2 od lutego 2021 r. do sierpnia 2021 r. była wykrywana jedynie u osób zakażonych przed grudniem 2020 r. U żadnej z zaszczepionych osób nie wykryto nowego zakażenia SARS-CoV-2.

Nie dostrzeżono różnic w seroprewalencji pod względem płci i wykonywanego zawodu. W zależności od wieku, najwyższą częstość występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 zaobserwowano wśród uczestników w grupie wiekowej od 50 do 60 lat. Jednakże, biorąc pod uwagę stopień ryzyka zakażenia SARS-CoV-2, wyższy odsetek osób seropozytywnych w GaOW stwierdzono w grupie pielęgniarek niż lekarzy, przeciwnie do DIDaCN.

Poziom przeciwciał klasy IgG po zakażeniu SARS-CoV-2 określany za pomocą ilościowego testu immunoblot różnił się pomiędzy uczestnikami i wynosił od 0,73 do 139 kU/L dla przeciwciał przeciwko białku S i od 0,73 do 119 kU/L dla przeciwciał przeciwko białku N

SARS-CoV-2. Czynniki takie jak płeć, wiek czy czas po infekcji SARS-CoV-2 nie wpłynęły znacząco na poziom przeciwciał. Poziom przeciwciał był natomiast skorelowany z przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2, a mianowicie im cięższy przebieg zakażenia SARS-CoV-2, tym wyższy poziom przeciwciał. Pomiędzy lutym a sierpniem 2021 r. poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko białko N SARS-CoV-2 u większości osób zmalał średnio o ok. 85%, a u czterech osób uległ zwiększeniu z nieznanymi przyczyn. Można przypuszczać, że zaobserwowany wzrost miana przeciwciał związany jest z ponownym zakażeniem koronawirusem lub chorobami autoimmunologicznymi. W ciągu siedmiu miesięcy przeciwciała zanikły całkowicie u 19 osób, przy czym nie powiązano tego faktu z żadnym badanym parametrem.

Po rozpoczęciu szczepień przeciwko COVID-19 pod koniec grudnia 2020 r., około dwa miesiące po przyjęciu drugiej dawki szczepionki BNT162b2 przez uczestników badania, przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 wykryto u wszystkich osób. Poziom przeciwciał określony za pomocą ilościowego testu ELISA wahał się od 287 do 19,363 BAU/mL. W ciągu kolejnych siedmiu miesięcy poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 u niemal wszystkich uczestników obniżył się średnio o ok. 90%, przy czym u dwóch osób doszło do jego zwiększenia z nieznanymi powodów, a u czterech osób nie wykryto wcale przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2. Poziom przeciwciał poszczepiennych nie korelował z płcią ani wiekiem uczestników. Zaobserwowano natomiast korelację poziomu przeciwciał z wcześniejszym zakażeniem SARS-CoV-2 i jego przebiegiem. Poziom przeciwciał był wyższy u osób wcześniej zakażonych SARS-CoV-2, a im cięższe objawy towarzyszyły zakażeniu SARS-CoV-2 tym więcej obserwowano przeciwciał. Nie stwierdzono zależności między tempem obniżania się poziomu przeciwciał a żadnym badanym czynnikiem.

Podsumowując, wykazano, że pracownicy medyczni mający częstszy kontakt z pacjentami chorymi na COVID-19 nie byli bardziej narażeni na zakażenie SARS-CoV-2 niż pracownicy medyczni mający mniejszą styczność z pacjentami chorymi na COVID-19. Przyjęcie szczepionki BNT162b2 przez pracowników medycznych zapobiegło nowym przypadkom zakażeń po trzeciej fali pandemii COVID-19. Wykazano, że poziom przeciwciał po zakażeniu SARS-CoV-2 jest tym większy, im cięższy jest przebieg zakażenia. Analogicznie, im silniejsza odpowiedź organizmu na wcześniejsze zakażenie SARS-CoV-2 i cięższy przebieg COVID-19, tym więcej wytworzonych przeciwciał poszczepiennych. Przeciwciała poszczepienne były wykrywane również siedem miesięcy po szczepieniu, przy czym ich poziom zmalał drastycznie od czasu badania wykonanego około dwa miesiące po szczepieniu drugą dawką.

6.3. Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.

Lorent D, Nowak R, Jankowska M, Kuszel Ł, Zmora P.

Vaccines. 2023; 11(1):118.

Dane opisane w publikacji uzyskano w wyniku badań przeprowadzonych w okresie od lutego do września 2021 r., kiedy to globalna liczba przypadków zakażeń SARS-COV-2 wzrosła z ponad 102,1 mln do ponad 231,4 mln, przy czym w Polsce odnotowano wzrost z ponad 515,5 tys. do ponad 2,9 mln zakażeń SARS-CoV-2. Liczba zgonów z powodu COVID-19 na świecie wzrosła z ponad 2,2 mln do ponad 4,7 mln, natomiast w Polsce stwierdzono wzrost z ponad 37,2 tys. do prawie 76 tys. zgonów [9].

Mając na uwadze zaprezentowane wcześniej wyniki [128] i dane literaturowe potwierdzające znaczne obniżenie się poziomu przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 po kilku miesiącach od infekcji SARS-CoV-2 albo szczepieniu [129-131], postanowiono poddać badaniu kolejną grupę zawodową - nauczycieli, którzy ze względu na zwiększone ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 należeli do priorytetowej grupy objętej szczepieniami przeciwko COVID-19. Co więcej, w przypadku nauczycieli zastosowano różne preparaty szczepionkowe, dzięki czemu możliwe było porównanie ich skuteczności. Dla nauczycieli generalnie rekomendowano szczepionkę ChAdOx1 z trzymiesięcznym odstępem pomiędzy dawkami. Wyjątek stanowili nauczyciele akademicy uniwersytetów medycznych, którzy ze względu na bezpośrednie zaangażowanie w walkę z pandemią COVID-19 otrzymali wcześniej szczepionkę BNT162b2 z trzytygodniowym odstępem pomiędzy dawkami [116]. Celem niniejszej pracy było (i) określenie poziomu przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 po dwóch i 12 tygodniach po przyjęciu obu dawek szczepionki przeciwko COVID-19, (ii) porównanie odpowiedzi na szczepionki przeciwko COVID-19 oparte o dwie różne platformy technologiczne: mRNA i wektorową.

W badaniach wzięło udział 81 nauczycieli z Poznania spośród ponad 200 zaproszonych osób. 36 nauczycieli uczyło w różnych szkołach podstawowych, a 45 osób było zatrudnionych na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i jednocześnie brało czynny udział w walce z pandemią COVID-19. Testy serologiczne u wykładowców akademickich Uniwersytetu Medycznego przeprowadzono w lutym 2021 r. i maju 2021 r., podczas gdy u nauczycieli szkół podstawowych były to miesiące czerwiec 2021 r. i wrzesień 2021 r. Podczas gdy w pierwszym punkcie czasowym do badań stawili się wszyscy uczestnicy, w drugim punkcie czasowym zgłosiło się mniej osób (17 nauczycieli szkół podstawowych i 37 nauczycieli akademickich). W grupie badanej przeważały kobiety (91,67% nauczycieli szkół podstawowych i 86,67% nauczycieli akademickich). Średni wiek nauczycieli szkół podstawowych wynosił $45,3 \pm 11,7$ lat. Ponad połowa (52,78%) z nich

nie cierpiała na żadne choroby przewlekłe, a najczęstsze schorzenie występujące u 1/3 osób dotyczyło układu krążenia. Nauczyciele akademicy mieli średnio $37,9 \pm 13,2$ lat, a 4/5 z nich nie zgłosiło występowania przewlekłych problemów ze zdrowiem. Choroby przewlekłe najczęściej występujące w tej grupie obejmowały choroby układu krążenia (8,89%) i układu oddechowego (8,89%). W momencie przystąpienia do badania żaden z uczestników nie zadeklarował wcześniejszego zdiagnozowanego zakażenia SARS-CoV-2.

Badania świadczące o zakażeniu SARS-CoV-2 przeprowadzono z użyciem tzw. testu kasetkowego, określanego również jako test przepływu bocznego, czyli szybkiego testu immunochromatograficznego wykrywającego obecność przeciwciał klasy IgG oraz IgM przeciwko białku N SARS-CoV-2. Użycie testu kasetkowego wynikało z ograniczonej dostępności innych testów na rynku w czasie trwania badania. Mimo opisywanego wcześniej w literaturze wyższego ryzyka zakażenia SARS-CoV-2 u nauczycieli, nie stwierdzono wśród badanych osób obecności przeciwciał występujących wyłącznie po zakażeniu, tj. przeciwko białku N SARS-CoV-2, w żadnym punkcie czasowym po przyjęciu dwóch dawek szczepionki przeciwko COVID-19, niezależnie od typu przyjętej szczepionki oraz miejsca pracy.

Dwa tygodnie po otrzymaniu drugiej dawki szczepionki przeciwko COVID-19 przeciwciała przeciwko białku S SARS-CoV-2 wykryto u wszystkich uczestników. Poziom przeciwciał określany za pomocą ilościowego testu ELISA u osób zaszczepionych szczepionką BNT162b2 wahał się pomiędzy 388 a 3910 BAU/mL, podczas gdy u osób zaszczepionych szczepionką ChAdOx1 wynosił od 33 do 1897 BAU/mL. Średni poziom przeciwciał przeciwko białku S SARS-CoV-2 był istotnie wyższy u osób zaszczepionych szczepionką mRNA (1492 ± 700 BAU/mL) niż wektorową ($426,9 \pm 461$ BAU/mL). Warto podkreślić, że uczestnicy badania nie byli wcześniej zakażeni SARS-CoV-2, więc obecność przeciwciał wynikała tylko z odpowiedzi na antygen szczepionkowy. W ciągu kolejnych 10 tygodni poziom przeciwciał u większości osób zaszczepionych szczepionką mRNA obniżył się średnio o 90,8%, w tym u siedmiu osób nie wykryto w ogóle przeciwciał poszczepiennych. Niższe tempo zanikania przeciwciał (obniżenie poziomu o średnio 67,28%) zaobserwowano u większości osób, które otrzymały szczepionkę wektorową.

Podsumowując, po zaszczepieniu przeciwko COVID-19 stwierdzono wyższe miana przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2, a jednocześnie ich szybsze zanikanie u osób zaszczepionych szczepionką BNT162b2 niż ChAdOx1. Wysoką skuteczność obu preparatów szczepionkowych potwierdza brak zakażeń SARS-CoV-2 wśród nauczycieli w analizowanym okresie czasu, niezależnie od stopnia narażenia na SARS-CoV-2.

6.4. Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.

Lorent D, Nowak R, Figlerowicz M, Handschuh L, Zmora P.

Vaccines. 2024; 12(5): 475.

Badania, których wyniki opisano w pracy, zostały przeprowadzone w listopadzie 2022 r., w czasie gdy na świecie zdiagnozowano niemal 637,8 mln przypadków zakażeń SARS-CoV-2 i ponad 6,61 mln powiązanych z nimi zgonów, z czego w Polsce stwierdzono ponad 6,35 mln przypadków zakażeń SARS-CoV-2 i więcej niż 118 tys. zgonów [9]. Badania te stanowiły kontynuację poprzednio prowadzonych badań wśród pracowników medycznych o wysokim ryzyku zakażenia SARS-CoV-2 [128]. W momencie zakończenia poprzedniego badania, we wrześniu 2021 r. personelowi medycznemu w Polsce zaoferowano kolejną dawkę szczepionki mRNA przeciwko COVID-19 (trzecią w cyklu szczepień szczepionkami mRNA, zwaną także pierwszą dawką przypominającą w odniesieniu do pierwotnego dwudawkowego schematu szczepień). Niecały rok później, w sierpniu 2022 r. pracownicy medyczni mogli ponownie przyjąć kolejną dawkę szczepionki o składzie zaktualizowanym wobec różnych podwariantów omikrona (czwartą dawkę w cyklu szczepień mRNA, zwaną też drugą dawką przypominającą) [5]. Mając na uwadze szybki zanik poszczepiennych przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 po dwóch dawkach szczepionki BNT162b2 [128, 132], jak i skutecznie wdrożone działania zapobiegawcze przez pracowników medycznych DIDaCN przed wprowadzeniem szczepień przeciwko COVID-19 [128], celami niniejszej pracy było: (i) określenie poziomu przeciwciał po szczepieniu dawkami przypominającymi; (ii) zbadanie postawy personelu medycznego DIDaCN wobec nieobowiązkowych szczepień przypominających.

Grupa badana składała się z 69 pracowników medycznych DIDaCN, z czego zdecydowana większość brała udział w poprzednim badaniu. Odstęp od przyjęcia ostatniej dawki szczepionki do testu na obecność przeciwciał w listopadzie 2022 r. różnił się wśród badanych w zależności od liczby przyjętych dawek szczepionki. W przypadku osób, które otrzymały dwie dawki przypominające okres ten wynosił około dwóch miesięcy, u osób zaszczepionych jedną dawką przypominającą około 13 miesięcy, podczas gdy u osób, które nie zdecydowały się na żadną dawkę przypominającą ponad 18 miesięcy. Kobiety stanowiły 84,06% analizowanej populacji. Uczestnicy mieli średnio $41,44 \pm 13,71$ lat. Najwięcej osób (43,48%) pracowało jako pielęgniarki lub położne, 27,53% badanej populacji było lekarzami, a pozostali wykonywali obowiązki administracyjne. Mniej niż połowa badanych (44,93%) chorowała przewlekłe. W momencie rekrutacji ponad 2/3 uczestników (68,12%) zadeklarowało przebycie zakażenia SARS-CoV-2 potwierdzonego testem RT-PCR lub antygenowym.

W listopadzie 2022 r. przeciwciała klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 wykryto za pomocą testu ELISA u 39,1% pracowników medycznych, co stanowi prawie 7-krotny wzrost odsetka osób seropozytywnych w DIDaCN w porównaniu do sierpnia 2021 r. Wśród uczestników, którzy zgłosili zdiagnozowane wcześniej zakażenie SARS-CoV-2, obecność przeciwciał stwierdzono u 20 z 47 osób (42,55%). Ponadto, siedmiu pracowników medycznych (10,29%) niedeklarujących przebycia zakażenia SARS-CoV-2 posiadało przeciwciała klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2, co świadczy o bezobjawowym przebiegu zakażenia.

Przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 były wykrywalne z użyciem ilościowego testu ELISA u niemal wszystkich uczestników badania (98,56%), niezależnie od czasu od przyjęcia ostatniej dawki szczepionki ani liczby dawek przypominających. W poprzednim badaniu, tj. 15 miesięcy wcześniej, odsetek osób seropozytywnych z przeciwciałami klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 w DIDaCN wynosił 84,5%. Jedyna osoba w niniejszym badaniu, u której nie stwierdzono obecności przeciwciał nie przyjęła żadnej dawki przypominającej. U pozostałych osób, które nie otrzymały żadnej dawki przypominającej szczepionki, stwierdzono najniższe z obserwowanych miana przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 ($836,60 \pm 686,04$ BAU/mL). Należy mieć jednak na uwadze, że wszystkie osoby zaszczepione tylko dwoma obowiązkowymi dawkami szczepionki mRNA zadeklarowały przebycie potwierdzonego testem zakażenia COVID-19, więc obecność przeciwciał może u nich wynikać także z wcześniejszej infekcji SARS-CoV-2. Najwyższe miano przeciwciał zaobserwowano u uczestników, którzy otrzymali dwie dawki przypominające szczepionki przeciwko COVID-19 ($3990,17 \pm 2053,16$ BAU/mL).

Pierwsza dawka szczepień przypominających została przyjęta prawie przez wszystkich pracowników medycznych (92,75%). Na kontynuację szczepień przypominających (drugą dawkę) zdecydowała się połowa uczestników (50,73%). Pięć osób nie przyjęło żadnej dawki przypominającej po ukończeniu obowiązkowego cyklu szczepień dwoma dawkami szczepionki BNT162b2. Najwyższy odsetek osób zaszczepionych dodatkowymi dawkami stwierdzono w grupie lekarzy, następnie pielęgniarek i położnych, a najmniejszy wśród pracowników administracyjnych. Wszystkie osoby, które nie zaszczepiły się żadną dawką przypominającą zadeklarowały wcześniejsze zakażenie SARS-CoV-2 potwierdzone testem laboratoryjnym.

Trzech z pięciu uczestników, którzy nie otrzymali żadnych szczepień przypominających i pięciu z 29, którzy otrzymali tylko jedną dawkę przypominającą, nie chciało wypowiadać się na temat swojej decyzji o nieszczepieniu się. Czterech pracowników medycznych planowało przyjąć drugą dawkę przypominającą, gdy tylko będą kwalifikować się do szczepienia. Głównymi powodami nieprzyjmowania dawek przypominających wskazywanymi

przez ankietowanych były: (i) brak czasu; (ii) negatywne doświadczenia z poprzednich szczepień oraz (iii) wiara w odporność uzyskaną w wyniku przebytych infekcji SARS-CoV-2. Osoby, które nie przyjęły drugiej dawki przypominającej wyrażały dodatkowo obawy o bezpieczeństwo szczepionek i swoje zdrowie.

Podsumowując, prawie wszyscy pracownicy medyczni z wysokim ryzykiem zakażenia SARS-CoV-2 zostali zaszczepieni pierwszą dawką przypominającą, ale więcej niż dwóch na pięciu wahało się przed przyjęciem drugiej dawki przypominającej. Najniższe miana przeciwciał przeciwko białku S SARS-CoV-2 stwierdzono u osób, którzy nie otrzymali żadnej dawki przypominającej szczepionki, a najwyższe wśród pracowników zaszczepionych dwiema dawkami przypominającymi. Poprzednie negatywne doświadczenia związane ze szczepieniami, przekonania o ochronnym wpływie wcześniejszego zakażenia SARS-CoV-2, brak czasu oraz wątpliwości co do bezpieczeństwa szczepionek były najczęściej zgłaszanymi powodami, dla których personel medyczny nie zdecydował się przyjąć dawek przypominających.

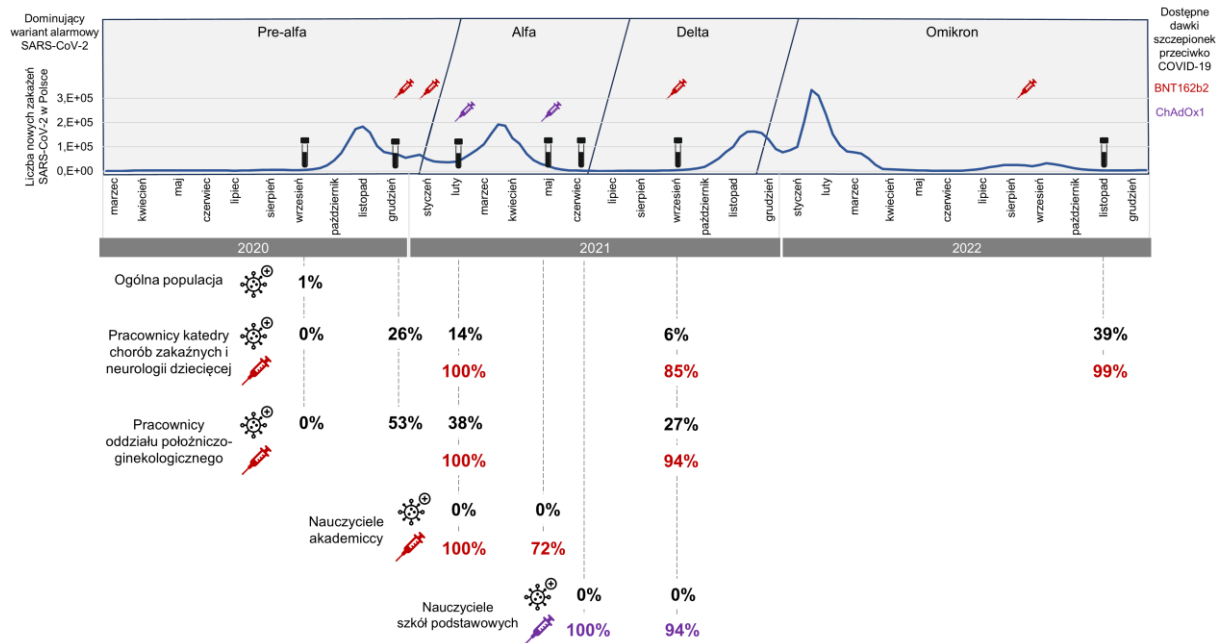
7. Dyskusja

Od czasu rozpoczęcia pandemii COVID-19 w marcu 2020 r. do marca 2024 r. w Polsce odnotowano ponad 6,6 mln potwierdzonych laboratoryjnie przypadków zakażeń SARS-CoV-2 i więcej niż 120 tys. powiązanych z nimi zgonów [9]. W odpowiedzi na pandemię w rekordowo szybkim tempie opracowano wiele szczepionek, przy czym po raz pierwszy wykorzystano technologię mRNA do ochrony przed chorobą zakaźną. Jednocześnie podjęto wiele wysiłków mających na celu zrozumienie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie SARS-CoV-2, określenie skuteczności szczepionek w ograniczaniu transmisji SARS-CoV-2, a także wpływu dalszej ewolucji SARS-CoV-2 na ucieczkę przed obroną immunologiczną [87]. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania dostarczyły informacji na temat seroprewalencji zakażeń SARS-CoV-2 w populacji Poznania w latach 2020-2022, przebiegu pandemii COVID-19, jak również zidentyfikowały czynniki wpływające na poziom przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 po zakażeniu wirusem albo po zaszczepieniu przeciwko COVID-19.

Oznaczanie seroprewalencji zakażeń danymi patogenami jest jedną z metod szacowania przebiegu epidemii/pandemii. Po pierwszej fali pandemii COVID-19, pomiędzy lipcem a wrześniem 2020, seroprewalencja zakażeń SARS-CoV-2 w ogólnej populacji Poznania i okolic wynosiła 0,93% [125]. Przyczyną niskiej częstości występowania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 było w dużej mierze wczesne wdrożenie w Polsce ograniczeń związanych z działalnością gospodarczą oraz aktywnością społeczną w marcu i kwietniu 2020 r., tuż po rozpoczęciu pandemii COVID-19 [6]. W tym samym czasie w Polsce stwierdzono niską liczbę zakażeń, która częściowo wynikała z niewielkiej liczby przeprowadzanych testów, obejmujących głównie osoby wykazujące objawy grypopodobne [5]. Jednakże, biorąc pod uwagę, że w badaniach opisanych w niniejszej pracy 1/3 osób nie wiedziało o zakażeniu SARS-CoV-2 ze względu na jego bezobjawowy charakter, można zakładać, że liczba zakażeń SARS-CoV-2 była wyższa niż to pokazują oficjalnie raportowane dane. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami metaanalizy obejmującej okres do kwietnia 2021 r., w której oszacowano, że 35,1% zakażeń SARS-CoV-2 przebiegało bezobjawowo [133]. Prawidłowe oszacowanie skali zakażeń i ryzyka transmisji SARS-CoV-2, w tym precyzyjna identyfikacja osób zakażonych z całym wachlarzem objawów oraz osób zakażonych ze skąpo- oraz bezobjawowym przebiegiem COVID-19 ma kluczowe znaczenie dla opracowania, wdrożenia i oceny skutecznych środków kontrolnych, szczególnie w okresie przed wprowadzeniem szczepień ochronnych.

Określenie obecności przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w populacji wielkopolskiej na przestrzeni lat 2020-2022 pozwoliło ponadto na identyfikację czynników ryzyka zakażenia SARS-CoV-2 oraz ocenę skuteczności szczepień. Odsetek osób w poszczególnych grupach

badanych posiadających przeciwciała przeciwko SARS-CoV-2 w określonym punkcie czasowym przedstawiono na Rycinie 5. Według wyników prac wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej, potwierdzonych dodatkowo danymi literaturowymi [56, 60], do grup wysokiego ryzyka zakażenia SARS-CoV-2 zaliczają się osoby w wieku powyżej 65 lat, nie przestrzegające zaleceń epidemiologicznych, niemające możliwości wykonywania pracy zdalnej oraz mające styczność z osobą zakażoną SARS-CoV-2.



Rycina 5. Wykres przedstawiający seroprevalencję zakażeń SARS-CoV-2 w Polsce od początku pandemii COVID-19 w marcu 2020 r. do grudnia 2022 r. Probówki krwi symbolizują moment pobrania prób od uczestników badania i wykonania testów serologicznych. Strzykawki symbolizują dostępność kolejnych dawek szczepionki BNT162b2 (Pfizer—BioNTech) (czerwony kolor) oraz ChAdOx1 (AstraZeneca) (fioletowy kolor) w Polsce. Pod wykresem oznaczono odsetek osób posiadających przeciwciała klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 w danej grupie badanej w określonym czasie. Po symbolu wirusa czarną czcionką podano odsetek osób posiadających przeciwciała klasy IgG przeciwko białku nukleokapsydu (N) SARS-CoV-2, świadczące o przebyciu zakażenia SARS-CoV-2. Częstość występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko białku kolca (S) SARS-CoV-2 powstających w wyniku zarówno zaszczepienia, jak i zakażenia SARS-CoV-2, podano po symbolu czerwonej strzykawki czerwoną czcionką dla osób zaszczepionych szczepionką BNT162b2 lub po symbolu fioletowej strzykawki fioletową czcionką dla osób zaszczepionych szczepionką ChAdOx1. Odsetek osób posiadających przeciwciała podano w zaokrągleniu do liczb całkowitych. Nad wykresem umieszczono dominujący w danym okresie wariant alarmowy SARS-CoV-2. Wykres przygotowano na podstawie [9, 53, 125, 128, 132, 134].

W dalszej części badań skupiono się na analizie seroprewalencji zakażeń SARS-CoV-2 wśród pracowników medycznych. Obecności przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 we wrześniu 2020 r. nie stwierdzono u personelu medycznego zarówno z Katedry i Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej w Poznaniu (DiDaCN), zaklasyfikowanej jako środowisko wysokiego ryzyka zakażenia SARS-CoV-2, ani z Oddziału Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Powiatowego we Wrześni (GaOW), któremu przypisano niskie ryzyko zakażenia SARS-CoV-2. Trzy miesiące później stwierdzono ponad dwukrotnie wyższą seroprewalencję w GaOW (52,5%) niż DiDaCN (26%) [128]. Również w innych pracach obejmujących oddziały ginekologiczno-położnicze stwierdzono wysoki poziom seroprewalencji wśród pracowników [135] oraz podwyższone ryzyko ponownej infekcji SARS-CoV-2 po zaszczepieniu przeciwko COVID-19 [136]. Natomiast wyniki metaanaliz dotyczących seroprewalencji wśród personelu medycznego nie są zgodne co do wpływu środowiska pracy [59, 127]. W badaniu porównującym wpływ zaangażowania w opiekę nad osobami z COVID-19 na seropozytywność wykazano, że personel medyczny narażony na częstszy kontakt z pacjentami z COVID-19 miał niewiele większe ryzyko seropozytywności w porównaniu z osobami bez kontaktu [137]. Wyższe ryzyko seropozytywności przypisano za to kontaktom w gospodarstwach domowych z większą liczbą osób [59] lub z osobami zakażonymi SARS-CoV-2 [58, 137]. Zatem zgodnie z omówionymi doniesieniami literaturowymi zwiększona seroprewalencja zakażeń SARS-CoV-2 obserwowana wśród pracowników medycznych z GaOW mogła nastąpić na skutek transmisji wirusa na drodze kontaktów domowych i pojawiania się lokalnych ognisk SARS-CoV-2. Znajduje to potwierdzenie w danych, zgodnie z którymi w styczniu 2021 zdiagnozowano ponad 2,5-krotnie wyższą liczbę przypadków zakażeń SARS-CoV-2 we Wrześni niż w Poznaniu w przeliczeniu na 100 000 mieszkańców [138]. Wyższa seropozytywność w GaOW mogła być też spowodowana specyfiką oddziału, tj. niewystarczającą ilością czasu na przeprowadzenie diagnostyki pod kątem COVID-19, a także samym zachowaniem kobiet podczas porodu, obejmującym intensywne oddychanie, w wyniku którego generowane są cząstki aerozolu będące główną drogą transmisji SARS-CoV-2 [135]. Warto podkreślić, że w metaanalizie, w której wykazano wpływ sprawowania opieki nad pacjentami z COVID-19 na wyższą seropozytywność, wyszczególniono także brak osobistych środków ochronnych [127]. Pracownicy DiDaCN mają większą dostępność i przeszkolenie w stosowaniu środków ochrony osobistej, a także doświadczenie w opiece nad pacjentami zakaźnymi niż pracownicy GaOW, co mogło mieć wpływ na wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie. Jednakże warto zauważyć, że w okresie do siedmiu miesięcy po zaszczepieniu dwoma dawkami szczepionki mRNA nie stwierdzono żadnych nowych przypadków zakażeń SARS-CoV-2, ani w DiDaCN ani w GaOW. Obserwacje te wskazują na skuteczną rolę szczepień ochronnych w okresie od lutego do września 2021 r. (na przełomie dominacji VOC alfa i delta) [128].

W niniejszej pracy nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał a wiekiem czy płcią uczestników badania. Wnioski te wyciągnięto zarówno na podstawie badania osób zakażonych SARS-CoV-2 jak i osób zaszczepionych przeciwko COVID-19 w różnych punktach czasowych [125, 128, 132, 134]. Obserwacje te są sprzeczne z doniesieniami o wydajniejszej produkcji przeciwciał u kobiet, zarówno w odpowiedzi na zakażenia wirusowe [89], jak i różne szczepionki [90, 91]. Dobrze udokumentowany jest również związek pomiędzy zaburzeniami układu odpornościowego towarzyszącymi starzeniu się, obejmującymi zapalenie starcze i immunosenescencję [92, 93], a osłabioną poszczepienną odpowiedzią immunologiczną [139] i większym ryzykiem ciężkiego przebiegu COVID-19 [67]. Wyniki pierwszych prac dotyczących wpływu wieku i płci na poziom przeciwciał klasy IgG po zakażeniu SARS-CoV-2 były niejednoznaczne [140], ale co ciekawe, w kilku późniejszych pracach odnotowano zwiększony poziom przeciwciał u osób starszych [141-143], niezależnie od płci [144] czy istnienia chorób współistniejących [145]. Podobnie jak w niniejszej pracy, korelacji pomiędzy stężeniem poszczepiennych przeciwciał klasy IgG a wiekiem czy płcią nie stwierdziło również kilka innych grup badaczy [129, 146, 147]. Jednakże większość autorów częściej raportowała statystycznie istotne niższe miana przeciwciał u mężczyzn [88, 148-153] i osób starszych [88, 148-156], a także powiązanie pomiędzy mianem przeciwciał a występowaniem chorób przewlekłych [149, 150, 157]. Różnice pomiędzy wyżej wymienionymi opublikowanymi wynikami dotyczącymi identyfikacji czynników związanych z mianem przeciwciał mogą wynikać m.in. z liczebności oraz struktury płci i wieku badanych grup [158], jak również zastosowania różnych metodologii rekrutowania ochotników do badań [159].

W jednej z prac włączonych w skład rozprawy doktorskiej wykazano, że poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2, badany w okresie do trzech miesięcy po zakażeniu SARS-CoV-2, koreluje z nasileniem objawów towarzyszących infekcji i jest tym większy, im ciężiej przebiegała infekcja [128]. Zjawisko produkcji dużej liczby przeciwciał w ciężkich przypadkach COVID-19, obserwowane również przez innych badaczy [147, 160, 161], może być spowodowane wzmożoną aktywacją komórek B wywołaną nadmiernym stanem zapalnym zwykle towarzyszącym ciężkiemu przebiegowi zakażenia SARS-CoV-2 [162]. Innym wytłumaczeniem może być zjawisko tzw. wzmocnienia zależnego od przeciwciał (ang. *antibody-dependent enhancement*, ADE), jednak jego występowanie w odniesieniu do SARS-CoV-2 jest tematem kontrowersyjnym, a przeprowadzona ostatnio metaanaliza wykluczyła wywoływanie ADE przez SARS-CoV-2 [163]. Pomimo że w niniejszej pracy wykazano występowanie korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał klasy IgG a przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2, wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw tej zależności wymaga dalszych badań.

Wyniki badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej sugerują, że na poziom przeciwciał po szczepieniu przeciwko COVID-19 miała również wpływ wcześniejsza infekcja SARS-CoV-2. Dwa tygodnie po przyjęciu drugiej dawki szczepionki mRNA wyższe miana przeciwciał stwierdzono bowiem u osób poprzednio seropozytywnych niż seronegatywnych w kierunku SARS-CoV-2. Ponadto, zachowana została korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał a przebiegiem zakażenia, czyli wyższe miana przeciwciał stwierdzono u osób zaszczepionych, u których wcześniej rozwinął się COVID-19 z ciężkim przebiegiem, a niższe u osób zaszczepionych, które przeszły infekcję bezobjawowo [128]. Podobne wnioski odnośnie wpływu przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 na poziom przeciwciał, badany w okresie do około miesiąca od przyjęcia drugiej dawki szczepionki mRNA, płyną z dostępnych danych literaturowych [151, 164-166]. W badaniach, w których zwracano uwagę na obraz kliniczny zakażenia SARS-CoV-2, z wyjątkiem jednej pracy [156] obserwowano analogiczny trend zależności poziomu przeciwciał poszczepiennych od ciężkości przebiegu wcześniejszego zakażenia SARS-CoV-2 [129, 147, 153, 167]. Reasumując, wyniki te wskazują na wydajniejszą produkcję przeciwciał poszczepiennych klasy IgG u osób poprzednio zakażonych wirusem SARS-CoV-2, co wynika z szybszej i skuteczniejszej niż pierwotna odpowiedzi wtórnej [86]. W literaturze opisano zgodny z oczekiwaniami wzrost miana przeciwciał po przyjęciu trzeciej dawki szczepionki mRNA (aż o 110% [168]), a otrzymanie kolejnej dawki szczepionki mRNA wiązało się z podobnymi lub nawet wyższymi szczytowymi poziomami przeciwciał [169]. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy najwyższe poziomy przeciwciał stwierdzono u osób, które otrzymały cztery dawki szczepionki mRNA, niższe u osób zaszczepionych trzema dawkami, a najniższe u osób, które przyjęły tylko dwie dawki szczepionki mRNA. Razem wzięte, obserwacje pozostają w zgodzie z mechanizmami leżącymi u podłoża pamięci immunologicznej, w której powtarzalne kontakty z antygenem wywołane ponownym zakażeniem albo przyjęciem kolejnych dawek przypominających szczepionki prowadzą do zwiększenia poziomu przeciwciał [86].

Oprócz czynników takich jak wcześniejsze zakażenie SARS-CoV-2, płeć, wiek i stan zdrowia na poziom przeciwciał wpływa również typ szczepionki. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy stwierdzono wyższe miano przeciwciał u osób zaszczepionych szczepionką mRNA niż wektorową po dwóch tygodniach od przyjęcia drugiej dawki szczepionki. Można by polemizować, że różnice poziomu przeciwciał wynikają z heterogenności grup badanych, gdyż osoby, które otrzymały szczepionkę mRNA były młodsze i zdrowsze niż osoby, które przyjęły szczepionkę wektorową. Jako że nikt z badanych nie posiadał przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 wykluczono wpływ poprzedniego zakażenia na poziom przeciwciał poszczepiennych. Z danych literaturowych wynika, że wiek, płeć oraz występowanie chorób przewlekłych mają mniejszy wpływ na poziom przeciwciał u osób zaszczepionych szczepionką wektorową niż mRNA [149].

Poparciem uzyskanych w niniejszej rozprawie wyników są prace innych autorów, którzy także zaobserwowali wyższy poziom przeciwciał generowanych w odpowiedzi na szczepienie z użyciem szczepionki mRNA niż wektorowej [149, 170-172]. Poznanie wpływu różnego typu preparatów i mechanizmów stymulacji przez nie odpowiedzi immunologicznej ma kluczowe znaczenie dla dalszego rozwoju szczepionek, nie tylko przeciwko COVID-19 [87, 173].

Kolejnym ważnym zagadnieniem poruszonym w niniejszej pracy była dynamika zmian poziomu przeciwciał klasy IgG po zakażeniu SARS-CoV-2 albo szczepieniu. Pomimo, że wszystkie osoby zaszczepione przeciwko COVID-19 wytworzyły przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 po dwóch tygodniach od przyjęcia drugiej dawki, po trzech miesiącach nie wykryto przeciwciał poszczepiennych u 28% osób, które przyjęły szczepionkę mRNA i 6% osób, które otrzymały szczepionkę wektorową [132]. Różnica ta może wynikać z krótszego szacowanego czasu półtrwania przeciwciał poszczepiennych w przypadku szczepionki mRNA (51 dni) niż wektorowej (79 dni) [149]. Stwierdzono również znaczne różnice w obniżaniu się miana przeciwciał, które zachodziło szybciej u osób zaszczepionych szczepionką mRNA niż wektorową. W porównaniu do poziomu bazowego, poziom przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 po upływie 3 miesięcy spadł o 90,8% w przypadku szczepionki mRNA i o 67,28% w przypadku szczepionki wektorowej [132]. Inni autorzy obserwowali zarówno podobny trend wolniejszego zanikania przeciwciał w ciągu trzech miesięcy u osób które otrzymały szczepionkę wektorową niż mRNA [149], ze spadkiem miana przeciwciał o 55% dla szczepionki wektorowej oraz o 80% dla szczepionki mRNA [171], jak i odwrotną tendencję spadkową, kiedy poziom przeciwciał obniżał się szybciej u osób zaszczepionych szczepionką wektorową (o od 62% do 85%) niż mRNA (o od 46% do 55%) [170, 172].

W badaniach opisanych w niniejszej pracy, ogólna seroprevalencja wśród osób zaszczepionych szczepionką mRNA była wyższa w grupach obejmujących osoby wcześniej zakażone SARS-CoV-2, zidentyfikowane na podstawie obecności przeciwciał przeciwko białku N SARS-CoV-2, produkowanemu wyłącznie na skutek zakażenia [128, 132, 134]. W grupie pracowników medycznych badanej po siedmiu miesiącach od przyjęcia drugiej dawki szczepionki mRNA 89,3% osób wciąż posiadało przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 przy podobnym procentowym spadku miana przeciwciał (o ok. 90% w porównaniu do poziomu bazowego) [128] jak w grupie nauczycieli badanej po trzech miesiącach [132]. Przeciwnie do badanych grup nauczycieli, w których żadna z osób nie była wcześniej zakażona SARS-CoV-2 [132], w badanej grupie pracowników medycznych ponad 1/3 uczestników przeszła zakażenie SARS-CoV-2 do trzech miesięcy przed szczepieniem. Wykonywane równocześnie badania poziomu przeciwciał przeciwko białku N SARS-CoV-2 wykazały, że przeciwciała były nadal wykrywalne u niewiele więcej niż połowy uczestników

(56,5%), a poziom ich spadku, wynoszący ok. 85%, był porównywalny do tempa spadku przeciwciał klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 [128]. W analizie przeprowadzonej ponad rok później wśród pracowników medycznych przeciwciała przeciwko białku S SARS-CoV-2 wykryto u niemal wszystkich badanych (98,56%), niezależnie od liczby przyjętych dawek szczepionek mRNA (od dwóch do czterech) oraz czasu, jaki upłynął od przyjęcia ostatniej dawki szczepionki do momentu badania (od osiemnastu do dwóch miesięcy). Jednocześnie obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 stwierdzono u 39,1% badanych [134]. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, gdyż jak udowodniono, wcześniejsze zakażenie SARS-CoV-2 zwiększa znacznie szczytowy poziom przeciwciał i okres ich półtrwania [149]. Potwierdzają to wyniki innych prac, w których oszacowano, że uśrednione tempo zanikania przeciwciał przeciwko białku S SARS-CoV-2 jest wyższe u osób zaszczepionych, które nie były zakażone przed szczepieniem (38% na miesiąc) [174] niż u osób, które nie były zaszczepione, ale zostały zakażone SARS-CoV-2 (5%-7% na miesiąc) [174, 175]. W innych badaniach przeprowadzonych na przestrzeni od czterech do dziesięciu miesięcy po przyjęciu dwóch dawek szczepionki mRNA wykazano, że poszczepienne przeciwciała klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 utrzymują się na poziomie wykrywalności u 79,4%-100% osób [148, 156, 174, 176, 177]. Analogicznie do uzyskanych w niniejszej pracy wyników, inni autorzy również obserwowali szybkie tempo zanikania poziomu przeciwciał poszczepiennych klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 po przyjęciu dwóch dawek szczepionki mRNA, w czwartym miesiącu o 85% [156] oraz w szóstym miesiącu o ok. 95% w porównaniu do poziomu bazowego po szczepieniu [148, 178].

Dane literaturowe dotyczące dynamiki zmian poziomu przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 po zakażeniu SARS-CoV-2 wskazują, że przeciwciała te są wykrywalne nawet do 16 miesięcy po zakażeniu SARS-CoV-2. W badaniach, w których poziom przeciwciał przeciwko białku S SARS-CoV-2 mierzono w jednym punkcie czasowym, pomiędzy ósmym a 16. miesiącem po zakażeniu SARS-CoV-2, seroprewalencja wynosiła od 89,2% do 96% [129, 131, 174, 179, 180]. Autorzy części z tych prac wskazywali na wyższe poziomy przeciwciał u osób po wcześniejszym zakażeniu SARS-CoV-2 charakteryzującym się ciężkim przebiegiem [179, 180]. Potwierdzają to wyniki innej pracy, w której obecność przeciwciał po roku od zakażenia SARS-CoV-2 stwierdzono jedynie u 25,6% osób, które przeszły infekcję SARS-CoV-2 bezobjawowo, podczas gdy u osób wykazujących objawy COVID-19 przeciwciała były wykrywalne u 87,9%-98,1% badanych w zależności od nasilenia przebiegu choroby [181]. Opisane w literaturze wyniki badań przeprowadzonych na przestrzeni dziewięciu miesięcy od zakażenia SARS-CoV-2 są rozbieżne. W jednej z prac stwierdzono obniżenie poziomu seroprewalencji z 98% do 90% pomiędzy pierwszym a ósmym miesiącem od zakażenia [182]. Z kolei w innej pracy wykazano, że przeciwciała produkowane na skutek

zakażenia SARS-CoV-2 wykrywano wśród 88%, 76% oraz 72% badanej populacji odpowiednio po 100, 200 oraz 250 dniach od zakażenia [175]. Można znaleźć także informacje o zmniejszeniu poziomu przeciwciał o 42% na przestrzeni trzech miesięcy [166] i o 50% na przestrzeni ponad sześciu miesięcy [179]. Niski odsetek osób posiadających przeciwciała zaraportowano w badaniu analizującym poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 na przestrzeni ośmiu miesięcy. W badaniu tym dwa miesiące po zakażeniu SARS-CoV-2 przeciwciała posiadało 81% osób, w czwartym miesiącu 69%, a w szóstym i ósmym miesiącu odpowiednio 43% i 42%. Jedynym czynnikiem powiązaniem z większym spadkiem poziomu był starszy wiek [183]. W innych pracach autorzy wykazali, że tempo spadku poziomu przeciwciał jest wolniejsze u osób młodszych [148, 174, 176, 178, 184], a także zaszczepionych, które były poprzednio zakażone SARS-CoV-2 niż u osób, które nie przechodziły wcześniej infekcji [176], nawet niezależnie od płci i wieku [156]. W żadnej z przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz nie zaobserwowano korelacji tempa zanikania przeciwciał z wiekiem, płcią czy ciężkością przebiegu wcześniejszej infekcji SARS-CoV-2.

Stopniowy spadek poziomu przeciwciał może wiązać się z ryzykiem (re)infekcji SARS-CoV-2. W badanej w niniejszej pracy grupie nauczycieli akademickich, w okresie od lutego do maja 2021 r., zdominowanym przez VOC alfa, zaobserwowano całkowitą odporność przeciwko zachorowaniu na COVID-19 po przyjęciu dwóch dawek szczepionki mRNA. Równie skuteczna w ochronie przed zakażeniem SARS-CoV-2 okazała się szczepionka wektorowa, którą zostali zaszczepieni nauczyciele szkół podstawowych. W okresie trzech miesięcy od przyjęcia drugiej dawki, od czerwca do września 2021 podczas dominacji VOC delta, żaden z nauczycieli nie zachorował na COVID-19. Warto zaznaczyć, że zarówno przed szczepieniami jak i po nich, żaden z nauczycieli nie był zakażony SARS-CoV-2, co jednocześnie wskazuje na skuteczne wdrożenie strategii profilaktycznych [132]. W szkołach podstawowych wprowadzono nauczanie zdalne od listopada 2020 r. do kwietnia 2021 r. z wyjątkiem okresu od połowy stycznia do połowy marca 2021 r., jednakże nawet w tym okresie podjęto dodatkowe środki zaradcze, a mianowicie po stwierdzeniu zakażenia SARS-CoV-2 u jednego dziecka kwarantannie podlegała cała klasa. Nauczyciele akademicy uczelni medycznej nie mieli dużego kontaktu ze studentami ze względu na prowadzenie większości zajęć w formie online [6], za to byli zaangażowani w diagnostykę zakażeń SARS-CoV-2. Brak przypadków zakażenia SARS-CoV-2 wynikał najprawdopodobniej z dobrego przygotowania merytorycznego i ścisłego przestrzegania wdrożonych procedur postępowania z materiałem biologicznym pobranym od pacjentów z podejrzeniem zakażenia SARS-CoV-2. Wysoka skuteczność szczepionek pomiędzy lutym a wrześniem 2021 r. zaobserwowana w niniejszej pracy jest zgodna z wynikami metaanalizy danych zebranych do września 2021 r. W badaniach klinicznych wyższą skuteczność zapobiegania objawowym infekcjom SARS-CoV-2 stwierdzono po przyjęciu dwóch dawek szczepionki mRNA (95%) niż wektorowej

(81%). Podczas gdy w badaniach klinicznych oba typy szczepionek były równie skuteczne przeciwko VOC alfa, beta, gamma oraz delta, dane dotyczące rzeczywistej skuteczności szczepionek wykazały wyższą skuteczność wobec szczepu typu dzikiego SARS-CoV-2 i VOC alfa oraz beta niż przeciwko VOC delta. Spadek ochrony przed zakażeniem SARS-CoV-2 zaobserwowano po sześciu miesiącach od przyjęcia drugiej dawki szczepionki [105]. Doniesienia literaturowe wskazywały na szybsze obniżenie efektu ochronnego szczepionek u osób starszych [185-187] oraz chorujących przewlekłe [185, 186]. Korzystny wpływ wcześniejszego zakażenia SARS-CoV-2 na skuteczność szczepionek zaobserwowano w jednej z prac, gdzie stwierdzono najwyższą odporność wśród osób, które przed szczepieniem były zakażone SARS-CoV-2, nawet jeżeli doszło do niego 18 miesięcy przed przyjęciem pierwszej dawki szczepionki [188]. Mając na uwadze, że ochrona zapewniona dwoma dawkami szczepionki albo przechorowaniem może być niewystarczająca w obliczu nowych VOC SARS-CoV-2 lub po upływie dłuższego czasu, niniejszą pracę uzupełniono o badania przeprowadzone w listopadzie 2022 r. wśród personelu medycznego z DIDaCN [134], po roku od rozpowszechnienia się w Polsce VOC omikron [53]. W porównaniu do sierpnia 2021 r. zaobserwowano wzrost odsetka osób z przeciwciałami klasy IgG przeciwko białku S SARS-CoV-2 z 84,5% do 98,56%, który częściowo wynikał z przyjęcia trzeciej dawki szczepionki mRNA przez 92,73% osób na rok przed badaniem oraz czwartej dawki szczepionki mRNA przez połowę osób (50,73%) na dwa miesiące przed badaniem. Obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2 stwierdzono natomiast u 39,13% pracowników medycznych [134], co stanowiło prawie 7-krotny wzrost częstości występowania przeciwciał świadczących o przebytych zakażeniach SARS-CoV-2 w porównaniu do sierpnia 2021 r. Wynik ten jest tym bardziej zaskakujący, że przed wprowadzeniem szczepień w grudniu 2021 r. odsetek osób w DIDaCN posiadających przeciwciała wynosił 26% i był ponad 2-krotnie niższy niż wśród pracowników GaOW mających znacznie rzadszy kontakt z pacjentami zakażonymi SARS-CoV-2 [128]. Przyczyną wzrostu seroprewalencji może być stopniowe znoszenie obostrzeń w Polsce od marca 2022 r. aż do odwołania stanu epidemii w maju 2022 r. Decyzja ta została uzasadniona poprawą stanu epidemiologicznego i mniejszą liczbą nowych przypadków zakażeń SARS-CoV-2 [6, 8], która mogła jednak wynikać ze zmienionej strategii testowania i wiążącym się z nią niedoszacowaniem skali pandemii COVID-19. Przypuszczenie to znajduje poparcie w metaanalizie wskazującej, że ponowne infekcje SARS-CoV-2 występowały częściej w okresie dominacji VOC omikron niż wcześniejszych VOC [189].

W literaturze do czynników większego ryzyka ponownej infekcji SARS-CoV-2 zaliczono płeć żeńską, występowanie chorób przewlekłych, brak przeciwciał klasy IgG przeciwko białku N SARS-CoV-2, przebycie zakażenia w okresie dominacji VOC delta i omikron oraz brak szczepień [189]. Kolejnym powodem częstszych zakażeń wśród personelu medycznego

DIDaCN po sierpniu 2021 r. może być obniżenie efektu ochronnego szczepienia. Wyniki metaanaliz wskazują na przywrócenie wysokiego poziomu ochrony przed zakażeniem SARS-CoV-2 po przyjęciu trzeciej albo czwartej dawki szczepionki mRNA, ale jego znaczny spadek w ciągu kolejnych sześciu miesięcy [190-193], przy czym w jednej z prac stwierdzono wyjściowy niższy poziom skuteczności szczepionek wobec VOC omikron niż innych VOC [192]. Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano wzrost seroprewalencji wśród pracowników DIDaCN po szczytowych falach zakażeń spowodowanych VOC delta i omikron, pomimo przyjęcia przez niemal wszystkich badanych trzeciej dawki szczepionki mRNA i kontynuacji szczepień kolejną dawką szczepionki mRNA przez połowę osób. Wnioski płynące z analiz obejmujących różne VOC SARS-CoV-2 wskazują na ciągłą potrzebę monitorowania ochronnego efektu szczepień jak i podejmowania dodatkowych działań na poziomie indywidualnym i populacyjnym, które mogą przyczyniać się do redukcji transmisji SARS-CoV-2.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy przyczyniły się do lepszego zrozumienia wybranych aspektów odpowiedzi obronnej organizmu na zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie przeciwko COVID-19, jak również dostarczyły wniosków dotyczących strategii zapobiegania i kontroli zakażeń wprowadzonych w czasie pandemii COVID-19 w Wielkopolsce w latach 2020-2022. Jednakże badania te mają również kilka ograniczeń. Jednym z nich jest nadreprezentacja kobiet we wszystkich badanych grupach, szczególnie w grupach obejmujących osoby o zwiększonym ryzyku zakażenia SARS-CoV-2. Dodatkowo, rekrutacja do badania ogólnej populacji wielkopolski odbywała się za pośrednictwem formularza on-line, co z jednej strony mogło utrudnić zapis osobom starszym, ale z drugiej pozwoliło na zgłoszenie się dużej ilości osób. Mniejszą chęć udziału obserwowano w przypadku osób o zwiększonym ryzyku zakażenia SARS-CoV-2, co wpłynęło na niską liczebność i różnorodność tych grup. Większy odsetek kobiet we wczesnych badaniach obserwacyjnych nad szczepionkami przeciwko COVID-19 odnotowano także w literaturze, co najprawdopodobniej wynika ze struktury demograficznej priorytetowo szczepionych grup [194], takich jak personel medyczny czy nauczyciele, wśród których w Polsce przeważają kobiety w wieku powyżej 40 lat [195, 196]. Fakt ten jest również powodem, dla którego grupy badane nie były ujednoczone pod względem parametrów demograficznych. Tym samym, przeprowadzone w niniejszej pracy badania odzwierciedlają rzeczywistą strukturę wybranych grup zawodowych i zapewniają wgląd w status ich odporności. Zaletą niniejszej pracy jest również rozciągnięcie badań w czasie i określanie w każdym punkcie czasowym występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko białkom N i S SARS-CoV-2, co pozwoliło na monitorowanie zakażeń SARS-CoV-2 również po wprowadzeniu szczepień przeciwko COVID-19 i ocenę rzeczywistej skuteczności szczepionek. Oprócz przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 w odpowiedzi humoralnej

uczestniczą także inne klasy immunoglobulin, jednakże ze względu na uzyskanie fałszywie pozytywnych wyników dla przeciwciał klasy IgA przeciwko SARS-CoV-2 w pierwszym badaniu, na późniejszych etapach zrezygnowano z analizy innych klas przeciwciał. Na pamięć immunologiczną ma również wpływ odpowiedź typu komórkowego, więc aby uzyskać pełny obraz odpowiedzi immunologicznej na zakażenie SARS-CoV-2 albo szczepienie należałoby zbadać wszystkie swoiste i nieswoiste mechanizmy układu odpornościowego. Na zakończenie warto zaznaczyć, że pomimo iż wirus SARS-CoV-2 został po raz pierwszy zidentyfikowany w 2019 r., nadal nie określono zabezpieczającego miana przeciwciał IgG, które mogłoby zapewnić długotrwałą ochronę osób zaszczepionych, a tym samym ograniczyć transmisję SARS-CoV-2.

8. Podsumowanie i perspektywy

Na podstawie przeprowadzonych badań:

1. Stwierdzono, że seroprewalencja po pierwszej fali pandemii COVID-19 w ogólnej populacji Poznania i okolic wynosiła 0,93%, a wśród objętych badaniem pracowników medycznych prewalencja przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 wynosiła 0%. W ciągu kilku miesięcy odsetek osób wykazujących obecność przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 wzrósł do 26% w grupie pracowników medycznych z DIDaCN i do 52,5% w grupie pracowników medycznych z GaOW. Po fali zimowej na przełomie lat 2020 i 2021 nie stwierdzono obecności przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2 w badanej grupie nauczycieli akademickich uniwersytetu medycznego. Podobnie, po fali wiosennej w 2021 r. spowodowanej VOC alfa nie wykryto zakażeń wśród objętych badaniem nauczycieli szkół podstawowych.
2. Ustalono, że odsetek osób ze skąpo- lub bezobjawowym przebiegiem zakażenia SARS-CoV-2 wynosił od 10,29% do 35,71% w zależności od badanej grupy, co pozwala przypuszczać, że rzeczywista liczba zakażeń SARS-CoV-2 była niedoszacowana.
3. Wytypowano osoby o podwyższonym ryzyku zakażenia SARS-CoV-2, do których zaliczono osoby w wieku powyżej 65 lat, nie przestrzegające zaleceń epidemiologicznych, pracujące w zawodach wymagających częstych kontaktów społecznych oraz mające styczność z osobą zakażoną SARS-CoV-2. Jednocześnie stwierdzono, że ryzyko zakażenia SARS-CoV-2 wśród pracowników medycznych, związane z bezpośrednim kontaktem z osobami chorymi na COVID-19, zależy od przeszkolenia w stosowaniu środków ochrony osobistej i dostępności do nich, doświadczenia w opiece nad pacjentami zakaźnymi, a także obowiązujących restrykcji. Wydaje się, że skuteczne wdrożenie strategii profilaktycznych w sektorze edukacji, obejmujące m.in. wprowadzenie nauczania zdalnego, w znaczący sposób wpłynęło na brak zakażeń SARS-CoV-2 wśród badanych nauczycieli w badanym okresie.
4. Wykazano, że poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2 do trzech miesięcy po zakażeniu SARS-CoV-2 koreluje z nasileniem objawów towarzyszących infekcji i jest tym większy, im ciężiej przebiegała infekcja. Udowodniono występowanie korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał klasy IgG po szczepieniu a wcześniejszym przebyciem zakażenia SARS-CoV-2 i przebiegiem zakażenia. Wyższe miana przeciwciał stwierdzono u osób zaszczepionych, u których wcześniej rozwinął się COVID-19 z ciężkim przebiegiem, a niższe u osób zaszczepionych, które przeszły infekcję bezobjawowo. Najniższe poziomy

przeciwciał stwierdzono u osób zaszczepionych, które nie były wcześniej zakażone SARS-CoV-2. Ponadto potwierdzono, że przyjęcie kolejnych dawek szczepionek BNT162b2 prowadzi do zwiększenia miana przeciwciał klasy IgG przeciwko SARS-CoV-2, co wynika z szybszej i skuteczniejszej niż pierwotna wtórnej odpowiedzi immunologicznej przy ponownym kontakcie z antygenem. Wyniki te dostarczają użytecznych informacji w kontekście planowania strategii szczepień.

5. Stwierdzono wyższe miano przeciwciał klasy IgG i szybszy spadek przeciwciał w ciągu ok. 12 tygodni od przyjęcia drugiej dawki szczepionki u osób zaszczepionych szczepionką mRNA w porównaniu do osób zaszczepionych szczepionką wektorową. Informacje o różnicach w dynamice odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez szczepionki oparte o różne platformy technologiczne mają kluczowe znaczenie dla dalszego rozwoju szczepionek, nie tylko przeciwko COVID-19.
6. Określono, że miano przeciwciał klasy IgG po zakażeniu SARS-CoV-2 albo szczepieniu przeciwko COVID-19 szybko ulega zmniejszeniu. Drastyczny spadek odnotowano w grupach badanych zarówno po trzech, siedmiu jak i 18 miesiącach od przyjęcia drugiej dawki szczepionki. Wśród osób zaszczepionych szczepionką mRNA wyższą częstość występowania przeciwciał przeciwko białku S SARS-CoV-2 zaobserwowano u osób posiadających jednocześnie przeciwciała przeciwko białku N SARS-CoV-2, co dowodzi, że wcześniejsze zakażenie SARS-CoV-2 zwiększa znacznie szczytowy poziom przeciwciał i okres ich półtrwania.
7. Nie stwierdzono nowych przypadków zakażeń SARS-CoV-2 w okresie od lutego do września 2021 r. podczas dominacji VOC alfa i delta wśród objętych badaniem zaszczepionych pracowników medycznych ani nauczycieli. Jednakże, pomimo przyjęcia trzeciej dawki szczepionki BNT162b2 przez niemal wszystkich pracowników medycznych z DIDaCN, po falach zakażeń spowodowanych VOC omikron odsetek osób posiadających przeciwciała przeciwko białku N SARS-CoV-2 wzrósł prawie 7-krotnie, co wskazuje, że infekcje SARS-CoV-2 występowały częściej w okresie dominacji VOC omikron niż wcześniejszych VOC. Przyczyną wzrostu seroprewalencji może być także stopniowe znoszenie obostrzeń w Polsce od marca 2022 r. aż do odwołania stanu epidemii w maju 2022 r. Decyzja ta została uzasadniona poprawą stanu epidemiologicznego i mniejszą liczbą nowych przypadków zakażeń SARS-CoV-2, która mogła jednak wynikać ze zmienionej strategii testowania i wiążącym się z nią niedoszacowaniem skali pandemii COVID-19. Wnioski płynące z analiz obejmujących różne VOC SARS-CoV-2 wskazują na ciągłą potrzebę monitorowania ochronnego efektu szczepień jak i podejmowania

dodatkowych działań na poziomie indywidualnym i populacyjnym, które mogą przyczynić się do redukcji transmisji SARS-CoV-2.

Pomimo, że w maju 2023 r. WHO ogłosiła, że SARS-CoV-2 nie stanowi już zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym [10], wirus ten ciągle krąży i ewoluuje, a zwiększająca się liczba dowodów o szkodliwych długofalowych skutkach zakażenia (tzw. long COVID) [68-70] podkreśla wagę wciąż aktualnego problemu.

Zebrany w ramach prowadzonych badań materiał biologiczny stanowi unikatową kolekcję, która może być wykorzystana w dalszych badaniach nad czynnikami wpływającymi na zakażenie wirusami albo na odpowiedź immunologiczną, jak i w analizie skuteczności przeciwciał neutralizujących, nabytych na drodze zakażenia SARS-CoV-2 albo szczepienia przeciwko COVID-19, wobec nowo pojawiających się wariantów genetycznych koronawirusa.

W kolejnym etapie badań planowana jest analiza uwarunkowań genetycznych wpływających na transmisję oraz ciężkość przebiegu zakażenia SARS-CoV-2. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na znaczącą rolę czynników genetycznych w patofizjologii COVID-19 oraz podatności na (re)infekcję [197]. W niniejszej pracy, w każdej z badanych grup zidentyfikowano zarówno osoby, które przeszły infekcję SARS-CoV-2 bezobjawowo, jak i wymagające hospitalizacji. Celem dalszych analiz będzie określenie u tych osób wariantów genetycznych genów/białek odpowiedzialnych za wnikanie i aktywację proteolityczną białka S SARS-CoV-2, które jak wykazano, są związane z ciężkim przebiegiem COVID-19 [198, 199].

Połączenie danych z niniejszej pracy, obejmujących odpowiedź na zakażenie różnymi VOC albo szczepienie przeciwko COVID-19 z danymi pochodzącymi z sekwencjonowania genów kodujących białka zaangażowane we wnikanie wirusa pozwoli dokładnie zgłębić mechanizmy odpowiedzi immunologicznej i rozpowszechniania się SARS-CoV-2. Nowa wiedza nabyta w ramach tych badań będzie miała uniwersalny charakter, gdyż komórkowe czynniki gospodarza mają kluczowe znaczenie dla wnikania kilku klinicznie istotnych wirusów, w tym koronawirusów i wirusów grypy typu A [200].

9. Wykaz skrótów

ADE – zjawisko wzmocnienia zależnego od przeciwciał (ang. *antibody-dependent enhancement*)

Białko E – białko otoczki (ang. *envelope protein*)

Białko M – białko błony (ang. *membrane protein*)

Białko N – białko nukleokapsydu (ang. *nucleocapsid protein*)

Białko NSP – białko niestrukturalne (ang. *non-structural protein*)

Białko S – białko kolca (ang. *spike protein*)

BSL-3 – trzecia klasa bezpieczeństwa biologicznego (ang. *biosafety level 3*)

CD – domena łącznikowa (ang. *connector domain*)

CH – centralna helisa (ang. *central helix*)

CLIA – test chemiluminescencyjny (ang. *chemiluminescence immunoassay*)

COVID-19 – choroba wywołana przez SARS-CoV-2 (ang. *coronavirus disease 2019*)

CT – ogon cytoplazmatyczny (ang. *cytoplasmic tail*)

CTD – domena C-końcowa (ang. *C-terminal domain*)

DIDaCN – Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (ang. *Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Karol Jonscher's Clinical Hospital, Poznan University of Medical Sciences, Poznan*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMA – Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*)

ER – retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

ERCIG – przedział pośredni pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego (ang. *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*)

FCS – miejsce cięcia specyficzne dla furyny (ang. *furin cleavage site*)

FDA – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

FP – peptyd fuzyjny (ang. *fusion peptide*)

GA – aparat Golgiego (ang. *Golgi apparatus*)

GaOW – Oddział Położniczo-Ginekologiczny Szpitala Powiatowego we Wrześni (ang. *Gynecology and Obstetrics Ward, District Hospital, Wrzesnia*)

hACE2 – ludzki enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. *human angiotensin-converting enzyme 2*)

HCoV – ludzki koronawirus (ang. *human coronavirus*)

HR1 – powtórzenia heptapeptydu 1 (ang. *heptad repeat 1*)

HR2 – powtórzenia heptapeptydu 1 (ang. *heptad repeat 1*)

ICTV – Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IDRs – regiony wewnątrznie nieuporządkowane (ang. *intrinsically disordered regions*)

IFA – test immunofluorescencji (ang. *immunofluorescence assay*)
Komórki NK – ang. *natural killer cells*, naturalne komórki cytotoksyczne
MERS – bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (ang. *Middle East Respiratory Syndrome*)
MERS-CoV – koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego (ang. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)
MHC – kompleks zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)
NA – test neutralizacji (ang. *neutralization assay*)
NCBI – bioinformatyczna baza danych z zakresu biotechnologii, genomiki i medycyny (ang. *National Center for Biotechnology Information*)
NTD – domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*)
ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)
Pangolin – ang. *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages*, system nazewnictwa SARS-CoV-2 oparty na analizie filogenetycznej
RBD – domena wiążąca receptor (ang. *receptor binding domain*)
RTC – kompleks replikacji i transkrypcji (ang. *replication-transcription complex*)
RT-PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription - polymerase chain reaction*)
Sarbecovirus – podrodzaj obejmujący wszystkie wirusy podobne do SARS-CoV-1 (ang. *SARS-Betacoronavirus*)
SARS – ciężki ostry zespół oddechowy (ang. *severe acute respiratory syndrome*)
SARS-CoV-1 – pierwszy koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 1*)
SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
sgmRNA – mRNA powstałe na matrycy subgenomowego RNA
sgRNA – subgenomowe RNA (ang. *subgenomic RNA*)
Tc – cytotoksyczne limfocyty T (ang. *cytotoxic T cells*)
Th – pomocnicze limfocyty T (ang. *T helper cells*)
TM – domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*)
TMPRSS2 – transbłonowa proteaza serynowa typu 2 (ang. *type II transmembrane serine protease 2*)
UE – Unia Europejska
VOC – wariant alarmowy (ang. *variant of concern*)
VOI – wariant budzący zainteresowanie (ang. *variant of interest*)
vRNP – wirusowy kompleks rybonukleoproteinowy (ang. *viral ribonucleoprotein complex*)
WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)
+sgRNA – subgenomowe RNA o dodatniej polarności
-sgRNA – subgenomowe RNA o ujemnej polarności

10. Bibliografia

1. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China*, 2019. *N Engl J Med*, 2020. **382**(8): p. 727-733.
2. World Health Organisation. *A Timeline of WHO's COVID-19 Response in the WHO European Region*. 2021 [cited 2024 08/15]; Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/351782/WHO-EURO-2022-1772-41523-63024-eng.pdf?sequence=1>.
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V., *The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2*. *Nat Microbiol*, 2020. **5**(4): p. 536-544.
4. Yu, X. and N. Li, *Understanding the beginning of a pandemic: China's response to the emergence of COVID-19*. *J Infect Public Health*, 2021. **14**(3): p. 347-352.
5. Republic of Poland. *Polish Ministry of Health*. 2024 [cited 2024 05/14]; Available from: <https://www.gov.pl/web/zdrowie/>.
6. Republic of Poland. *Coronavirus: information and recommendations*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.gov.pl/web/koronawirus>.
7. Republic of Poland. *Service of the Ministry of Health and the National Health Fund*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://pacjent.gov.pl/>.
8. The Chancellery of the Sejm of The Republic of Poland. *Ordinance of the Minister of Health of May 12, 2022 on the cancellation of an epidemic state in the territory of the Republic of Poland*. 2024 [cited 2024 05/14]; Available from: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20220001027>.
9. World Health Organisation. *WHO COVID-19 dashboard*. 2024 [cited 2024 07/01]; Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/data?n=c>.
10. World Health Organisation. *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing – 5 May 2023*. 2023 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.who.int/news-room/speeches/item/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing---5-may-2023>.
11. Fihel, A., et al., *Unrecognised COVID-19 deaths in central Europe: The importance of cause-of-death certification for the COVID-19 burden assessment*. *PLoS One*, 2024. **19**(7): p. e0307194.
12. Cheng, L., et al., *Omicron COVID-19 Case Estimates Based on Previous SARS-CoV-2 Wastewater Load, Regional Municipality of Peel, Ontario, Canada*. *Emerg Infect Dis*, 2023. **29**(8): p. 1580-1588.
13. Lewis, H.C., et al., *SARS-CoV-2 infection in Africa: a systematic review and meta-analysis of standardised seroprevalence studies, from January 2020 to December 2021*. *BMJ Glob Health*, 2022. **7**(8).
14. Howley, P.M., Knipe, D. M., Whelan, S., Freed, E. O., & Cohen, J. L., *Fields Virology: RNA viruses*. 7th ed. 2022: Lippincott Williams&Wilki.
15. Markov, P.V., et al., *The evolution of SARS-CoV-2*. *Nat Rev Microbiol*, 2023. **21**(6): p. 361-379.
16. World Health Organisation. *Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003*. 2015 [cited 2024 08/15]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>.
17. Cheng, V.C., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2007. **20**(4): p. 660-94.
18. Stockman, L.J., R. Bellamy, and P. Garner, *SARS: systematic review of treatment effects*. *PLoS Med*, 2006. **3**(9): p. e343.
19. Ge, X.Y., et al., *Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor*. *Nature*, 2013. **503**(7477): p. 535-8.
20. World Health Organisation. *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1.
21. Group, F.-O.-W.M.T.W., *MERS: Progress on the global response, remaining challenges and the way forward*. *Antiviral Res*, 2018. **159**: p. 35-44.
22. Muller, M.A., et al., *MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983-1997*. *Emerg Infect Dis*, 2014. **20**(12): p. 2093-5.

23. Corman, V.M., et al., *Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat*. J Virol, 2014. **88**(19): p. 11297-303.
24. World Health Organisation. *MERS Situation Update*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://applications.emro.who.int/docs/WHOEMCSR751E-eng.pdf?ua=1>.
25. Omrani, A.S. and S. Shalhoub, *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): what lessons can we learn?* J Hosp Infect, 2015. **91**(3): p. 188-96.
26. World Health Organisation. *Middle East respiratory syndrome*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-cov.html>.
27. Zumla, A., et al., *Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options*. Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(5): p. 327-47.
28. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
29. Xiao, K., et al., *Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins*. Nature, 2020. **583**(7815): p. 286-289.
30. The Lancet, M., *Searching for SARS-CoV-2 origins: confidence versus evidence*. Lancet Microbe, 2023. **4**(4): p. e200.
31. Gostin, L.O. and G.K. Gronvall, *The Origins of Covid-19 - Why It Matters (and Why It Doesn't)*. N Engl J Med, 2023. **388**(25): p. 2305-2308.
32. Laue, M., et al., *Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 3515.
<https://app.biorender.com/biorender-templates>.
34. Yang, H. and Z. Rao, *Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development*. Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(11): p. 685-700.
35. Jackson, C.B., et al., *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(1): p. 3-20.
36. Koch, J., et al., *TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells*. EMBO J, 2021. **40**(16): p. e107821.
37. Chan, J.F., et al., *Altered host protease determinants for SARS-CoV-2 Omicron*. Sci Adv, 2023. **9**(3): p. eadd3867.
38. Alipoor, S.D. and M. Mirsaeidi, *SARS-CoV-2 cell entry beyond the ACE2 receptor*. Mol Biol Rep, 2022. **49**(11): p. 10715-10727.
39. Coutard, B., et al., *The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade*. Antiviral Res, 2020. **176**: p. 104742.
40. Ke, Z., et al., *Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions*. Nature, 2020. **588**(7838): p. 498-502.
41. Harvey, W.T., et al., *SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape*. Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(7): p. 409-424.
42. Guruprasad, L., G.K. Naresh, and G. Boggarapu, *Taking stock of the mutations in human SARS-CoV-2 spike proteins: From early days to nearly the end of COVID-19 pandemic*. Curr Res Struct Biol, 2023. **6**: p. 100107.
43. Du, L., et al., *MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals*. Expert Opin Ther Targets, 2017. **21**(2): p. 131-143.
44. Huang, Y., et al., *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. Acta Pharmacol Sin, 2020. **41**(9): p. 1141-1149.
45. Du, L., et al., *The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(3): p. 226-36.
46. Lu, S., et al., *The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 502.
47. Mu, J., et al., *SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells*. Sci China Life Sci, 2020. **63**(9): p. 1413-1416.
48. Carabelli, A.M., et al., *SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness*. Nat Rev Microbiol, 2023. **21**(3): p. 162-177.
49. World Health Organisation. *Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants*. 2023 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>.
50. Rambaut, A., et al., *A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology*. Nat Microbiol, 2020. **5**(11): p. 1403-1407.

51. Swiss-Prot Group of the SIB Swiss Institute of Bioinformatics. *Sars-CoV-2 circulating variants*. 2024 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://viralzone.expasy.org/9556>.
52. Chakraborty, C., et al., *Natural selection of the D614G mutation in SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant and its subvariants*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023. **31**: p. 437-439.
53. Hodcroft, E.B. *CoVariants: SARS-CoV-2 Mutations and Variants of Interest*. 2024 [cited 2024 07/01]; Available from: <https://covariants.org/>.
54. European Centre for Disease Prevention and Control. *Factsheet on COVID-19 2024* [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/z-disease-list/covid-19/factsheet-covid-19#transmission-of-covid-19>.
55. World Health Organisation. *Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?* 2021 [cited 2024 05/18]; Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>.
56. Harris, M., et al., *Risk factors for SARS-CoV-2 infection during the early stages of the COVID-19 pandemic: a systematic literature review*. *Front Public Health*, 2023. **11**: p. 1178167.
57. Beale, S., et al., *Differential Risk of SARS-CoV-2 Infection by Occupation: Evidence from the Virus Watch prospective cohort study in England and Wales*. *J Occup Med Toxicol*, 2023. **18**(1): p. 5.
58. Galanis, P., et al., *Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and associated factors in healthcare workers: a systematic review and meta-analysis*. *J Hosp Infect*, 2021. **108**: p. 120-134.
59. Kayi, I., et al., *The seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies among health care workers before the era of vaccination: a systematic review and meta-analysis*. *Clin Microbiol Infect*, 2021. **27**(9): p. 1242-1249.
60. Hoffmann, K., et al., *Association between Compliance with COVID-19 Restrictions and the Risk of SARS-CoV-2 Infection in Poland*. *Healthcare (Basel)*, 2023. **11**(6).
61. World Health Organisation. *COVID-19 Weekly Epidemiological Update*. 2021 [cited 2024 05/18]; Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20210202_weekly_epi_update_25.pdf.
62. Merad, M., et al., *The immunology and immunopathology of COVID-19*. *Science*, 2022. **375**(6585): p. 1122-1127.
63. Centers for Disease Control and Prevention. *Symptoms of COVID-19*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: https://www.cdc.gov/covid/signs-symptoms/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html.
64. Reiter, E.R., et al., *COVID-19-Associated Chemosensory Loss Continues to Decline*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2023. **169**(5): p. 1386-1389.
65. Centers for Disease Control and Prevention. *Underlying Conditions and the Higher Risk for Severe COVID-19*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/underlying-conditions.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlyingconditions.html.
66. World Health Organisation. *COVID-19: vulnerable and high risk groups*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/covid-19/information/high-risk-groups>.
67. Zhang, J., et al., *Risk factors for disease severity, unimprovement, and mortality in COVID-19 patients in Wuhan, China*. *Clin Microbiol Infect*, 2020. **26**(6): p. 767-772.
68. Centers for Disease Control and Prevention. *Long COVID Basics*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: https://www.cdc.gov/covid/long-term-effects/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/long-term-effects/index.html.
69. World Health Organisation. *Coronavirus disease (COVID-19): Post COVID-19 condition*. 2023 [cited 2024 08/01]; Available from: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-post-covid-19-condition](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-post-covid-19-condition).
70. Davis, H.E., et al., *Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations*. *Nat Rev Microbiol*, 2023. **21**(3): p. 133-146.
71. Centers for Disease Control and Prevention. *Overview of Testing for SARS-CoV-2*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: https://www.cdc.gov/covid/hcp/testing/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.htm.

72. Mercer, T.R. and M. Salit, *Testing at scale during the COVID-19 pandemic*. Nat Rev Genet, 2021. **22**(7): p. 415-426.
73. World Health Organisation. *Wastewater environmental surveillance 2024* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/wastewater>.
74. Diamond, M.B., et al., *Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses*. Nat Med, 2022. **28**(10): p. 1992-1995.
75. World Health Organisation. *Who should be tested for SARS-CoV-2? 2022* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/multi-media/details/who-should-be-tested-for-sars-cov-2>.
76. World Health Organisation. *When capacity is limited, who should be tested for SARS-CoV-2? 2022* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/multi-media/details/when-capacity-is-limited-who-should-be-tested-for-sars-cov-2>.
77. Puhach, O., B. Meyer, and I. Eckerle, *SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics*. Nat Rev Microbiol, 2023. **21**(3): p. 147-161.
78. U.S. Food and Drug Administration. *Understanding At-Home OTC COVID-19 Antigen Diagnostic Test Results*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/understanding-home-otc-covid-19-antigen-diagnostic-test-results>.
79. Dowlatshahi, S., E. Shabani, and M.J. Abdekhodaie, *Serological assays and host antibody detection in coronavirus-related disease diagnosis*. Arch Virol, 2021. **166**(3): p. 715-731.
80. Johns Hopkins University. *Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States*. 2020 [cited 2024 08/15]; Available from: <https://centerforhealthsecurity.org/sites/default/files/2023-02/200422-national-strategy-serology.pdf>.
81. Bendavid, E., *Seroprevalence Studies Are Critical Early Pandemic Tools, and They Were Underappreciated During COVID-19*. Am J Public Health, 2023. **113**(5): p. 523-524.
82. Mistry, P., et al., *SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 809244.
83. Grifoni, A., et al., *SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(7): p. 1076-1092.
84. Lapuente, D., T.H. Winkler, and M. Tenbusch, *B-cell and antibody responses to SARS-CoV-2: infection, vaccination, and hybrid immunity*. Cell Mol Immunol, 2024. **21**(2): p. 144-158.
85. Qi, H., et al., *The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection*. Nat Immunol, 2022. **23**(7): p. 1008-1020.
86. Pollard, A.J. and E.M. Bijker, *A guide to vaccinology: from basic principles to new developments*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(2): p. 83-100.
87. Tregoning, J.S., et al., *Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(10): p. 626-636.
88. Fernandes, M., et al., *Influence of age, gender, previous SARS-CoV-2 infection, and pre-existing diseases in antibody response after COVID-19 vaccination: A review*. Mol Immunol, 2023. **156**: p. 148-155.
89. Bunders, M.J. and M. Altfeld, *Implications of Sex Differences in Immunity for SARS-CoV-2 Pathogenesis and Design of Therapeutic Interventions*. Immunity, 2020. **53**(3): p. 487-495.
90. Flanagan, K.L., et al., *Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017. **33**: p. 577-599.
91. Klein, S.L., I. Marriott, and E.N. Fish, *Sex-based differences in immune function and responses to vaccination*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2015. **109**(1): p. 9-15.
92. Liu, Z., et al., *Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 200.
93. Bartleson, J.M., et al., *SARS-CoV-2, COVID-19 and the Ageing Immune System*. Nat Aging, 2021. **1**(9): p. 769-782.
94. Li, Y.D., et al., *Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19*. J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 104.
95. Kalinke, U., et al., *Clinical development and approval of COVID-19 vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2022. **21**(5): p. 609-619.
96. Krammer, F., *SARS-CoV-2 vaccines in development*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 516-527.
97. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products COMIRNATY 2024* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/comirnaty>.
98. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products SPIKEVAX*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/spikevax-0>.

99. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products COVID-19 Vaccine (Ad26.COV2-S [recombinant])*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/covid-19-vaccine-ad26cov2-s-recombinant>.
100. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products CONVIDECIA*. 2024; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/convidecia>.
101. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products Vaxzevria*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/vaxzevria>.
102. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products NUVAXOVID*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/nuvaxovid>.
103. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products COVID-19 Vaccine (Vero Cell), Inactivated*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/covid-19-vaccine-vero-cell-inactivated>.
104. World Health Organisation. *The Bharat Biotech BBV152 COVAXIN vaccine against COVID-19: What you need to know*. 2022 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-bharat-biotech-bbv152-covaxin-vaccine-against-covid-19-what-you-need-to-know>.
105. Fiolet, T., et al., *Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review*. Clin Microbiol Infect, 2022. **28**(2): p. 202-221.
106. Li, M., et al., *COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 146.
107. World Health Organisation. *Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process*. 2023 [cited 2024 08/01]; Available from: https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/Status_COVID_VAX_08August2023.pdf.
108. World Health Organisation. *COVID-19 advice for the public: Getting vaccinated 2023* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines/advice>.
109. European Medicines Agency. *Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna)*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna>.
110. European Medicines Agency. *Comirnaty*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>.
111. European Medicines Agency. *Nuvaxovid*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/nuvaxovid>.
112. World Health Organisation. *Prequalification of Medical Products COVID-19 Vaccines with WHO Emergency Use Listing*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://extranet.who.int/prequal/vaccines/covid-19-vaccines-who-emergency-use-listing>.
113. European Medicines Agency. *EMA recommends first COVID-19 vaccine for authorisation in the EU*. 2020 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-first-covid-19-vaccine-authorisation-eu>.
114. European Medicines Agency. *Vaxzevria (previously COVID-19 Vaccine AstraZeneca)*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca>.
115. European Medicines Agency. *Jcovden (previously COVID-19 Vaccine Janssen)*. 2024 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/jcovden-previously-covid-19-vaccine-janssen>.
116. Republic of Poland. *National Vaccination Program against COVID-19*. 2024 [cited 2024 05 /14]; Available from: <https://www.gov.pl/web/szczepimysie/narodowy-program-szczepien-przeciw-covid-19>.
117. European Centre for Disease Prevention and Control. *COVID-19 Vaccine Tracker*. 2023 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#national-ref-tab>.
118. World Health Organisation. *COVID-19 vaccine tracker and landscape 2023* [cited 2024 08/01]; Available from: <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19/covid-19-vaccine-tracker-and-landscape>.

119. Walkowiak, M.P., J. Domaradzki, and D. Walkowiak, *Are We Facing a Tsunami of Vaccine Hesitancy or Outdated Pandemic Policy in Times of Omicron? Analyzing Changes of COVID-19 Vaccination Trends in Poland*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(6).
120. Dziedzic, A., et al., *COVID-19 vaccine booster hesitancy (VBH) of healthcare professionals and students in Poland: Cross-sectional survey-based study*. Front Public Health, 2022. **10**: p. 938067.
121. Sobierajski, T., P. Rzymiski, and M. Wanke-Rytt, *Impact of the COVID-19 Pandemic on Attitudes toward Vaccination: Representative Study of Polish Society*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(6).
122. Rzymiski, P., B. Poniedzialek, and A. Fal, *Willingness to Receive the Booster COVID-19 Vaccine Dose in Poland*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(11).
123. Baj, J., et al., *COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge*. J Clin Med, 2020. **9**(6).
124. Nikolai, L.A., et al., *Asymptomatic SARS Coronavirus 2 infection: Invisible yet invincible*. Int J Infect Dis, 2020. **100**: p. 112-116.
125. Lorent, D., et al., *Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Poznan, Poland, after the First Wave of the COVID-19 Pandemic*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(6).
126. Gomez-Ochoa, S.A., et al., *COVID-19 in Health-Care Workers: A Living Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence, Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcomes*. Am J Epidemiol, 2021. **190**(1): p. 161-175.
127. Galanis, P.V., I.; Fragkou, D.; Bilali, A.; Kaitelidou, D., *Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies and Associated Factors in Healthcare Workers: A Systematic Review and Meta-Analysis*. The Journal of hospital infection, 2021(108): p. 120-134.
128. Lorent, D., et al., *The Longitudinal Analysis on the Anti-SARS-CoV-2 Antibodies among Healthcare Workers in Poland-Before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 Vaccination*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(10).
129. Moncunill, G., et al., *Determinants of early antibody responses to COVID-19 mRNA vaccines in a cohort of exposed and naive healthcare workers*. EBioMedicine, 2022. **75**: p. 103805.
130. Ali, H., et al., *Previous COVID-19 Infection and Antibody Levels After Vaccination*. Front Public Health, 2021. **9**: p. 778243.
131. Yang, Y., et al., *Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection*. Nat Microbiol, 2022. **7**(3): p. 423-433.
132. Lorent, D., et al., *Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 Homologous Vaccination Antibody Response among Teachers in Poznan, Poland*. Vaccines (Basel), 2023. **11**(1).
133. Sah, P., et al., *Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(34).
134. Lorent, D., et al., *Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Level and COVID-19 Vaccine Boosters among Healthcare Workers with the Highest SARS-CoV-2 Infection Risk-Follow Up Study*. Vaccines (Basel), 2024. **12**(5).
135. Bampoe, S., et al., *A cross-sectional study of immune seroconversion to SARS-CoV-2 in frontline maternity health professionals*. Anaesthesia, 2020. **75**(12): p. 1614-1619.
136. Alishaq, M., et al., *Risk factors for breakthrough SARS-CoV-2 infection in vaccinated healthcare workers*. PLoS One, 2021. **16**(10): p. e0258820.
137. Piccoli, L., et al., *Risk assessment and seroprevalence of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers of COVID-19 and non-COVID-19 hospitals in Southern Switzerland*. Lancet Reg Health Eur, 2021. **1**: p. 100013.
138. Center, P.S.a.N. *Visualization of pandemic status and dynamics*. 2022 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://covidhub.psnc.pl/mapa/>.
139. Dietz, L.L., et al., *Impact of age and comorbidities on SARS-CoV-2 vaccine-induced T cell immunity*. Commun Med (Lond), 2023. **3**(1): p. 58.
140. Post, N., et al., *Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review*. PLoS One, 2020. **15**(12): p. e0244126.
141. Whelan, M., et al., *Cross-sectional Characterization of SARS-CoV-2 Antibody Levels and Decay Rates Following Infection of Unvaccinated Elderly Individuals*. Open Forum Infect Dis, 2023. **10**(8): p. ofad384.
142. Yang, H.S., et al., *Association of Age With SARS-CoV-2 Antibody Response*. JAMA Netw Open, 2021. **4**(3): p. e214302.
143. Oktay Gultekin, E., et al., *Antibody response three months after SARS-CoV-2 infection*. J Med Virol, 2022. **94**(10): p. 4712-4718.

144. Zhai, B., et al., *SARS-CoV-2 Antibody Response Is Associated with Age and Body Mass Index in Convalescent Outpatients*. J Immunol, 2022. **208**(7): p. 1711-1718.
145. Cohen, K.W., et al., *Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells*. Cell Rep Med, 2021. **2**(7): p. 100354.
146. Wheeler, S.E., et al., *Differential Antibody Response to mRNA COVID-19 Vaccines in Healthy Subjects*. Microbiol Spectr, 2021. **9**(1): p. e0034121.
147. Tretyn, A., et al., *Differences in the Concentration of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies Post-COVID-19 Recovery or Post-Vaccination*. Cells, 2021. **10**(8).
148. Papaioannidou, P., et al., *Age, Sex and BMI Relations with Anti-SARS-CoV-2-Spike IgG Antibodies after BNT162b2 COVID-19 Vaccine in Health Care Workers in Northern Greece*. Microorganisms, 2023. **11**(5).
149. Wei, J., et al., *Antibody responses and correlates of protection in the general population after two doses of the ChAdOx1 or BNT162b2 vaccines*. Nat Med, 2022. **28**(5): p. 1072-1082.
150. Lustig, Y., et al., *BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal cohort study in health-care workers*. Lancet Respir Med, 2021. **9**(9): p. 999-1009.
151. Kontou, E., et al., *Antibody Response Following a Two-Dose mRNA Vaccination Regimen, in Health Care Workers of a Tertiary Hospital in Athens, Greece*. J Pers Med, 2021. **11**(6).
152. Fujigaki, H., et al., *Antibody Responses to BNT162b2 Vaccination in Japan: Monitoring Vaccine Efficacy by Measuring IgG Antibodies against the Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2*. Microbiol Spectr, 2022. **10**(1): p. e0118121.
153. Amodio, E., et al., *Antibodies Responses to SARS-CoV-2 in a Large Cohort of Vaccinated Subjects and Seropositive Patients*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(7).
154. Reusch, J., et al., *Influencing factors of anti-SARS-CoV-2-spike-IgG antibody titers in healthcare workers: A cross-section study*. J Med Virol, 2023. **95**(1): p. e28300.
155. Muller, L., et al., *Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination*. Clin Infect Dis, 2021. **73**(11): p. 2065-2072.
156. Brisotto, G., et al., *IgG antibodies against SARS-CoV-2 decay but persist 4 months after vaccination in a cohort of healthcare workers*. Clin Chim Acta, 2021. **523**: p. 476-482.
157. Ward, V., et al., *SARS-CoV-2 antibody responses post-vaccination in UK healthcare workers with pre-existing medical conditions: a cohort study*. BMJ Open, 2022. **12**(12): p. e066766.
158. Rzas, K. and M. Ciski, *Influence of the Demographic, Social, and Environmental Factors on the COVID-19 Pandemic-Analysis of the Local Variations Using Geographically Weighted Regression*. Int J Environ Res Public Health, 2022. **19**(19).
159. Gajda, M., M. Kowalska, and J.E. Zejda, *Impact of Two Different Recruitment Procedures (Random vs. Volunteer Selection) on the Results of Seroepidemiological Study (SARS-CoV-2)*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(18).
160. Roltgen, K., et al., *Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome*. Sci Immunol, 2020. **5**(54).
161. Lynch, K.L., et al., *Magnitude and Kinetics of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Responses and Their Relationship to Disease Severity*. Clin Infect Dis, 2021. **72**(2): p. 301-308.
162. Merad, M. and J.C. Martin, *Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 355-362.
163. Gan, L., et al., *Does potential antibody-dependent enhancement occur during SARS-CoV-2 infection after natural infection or vaccination? A meta-analysis*. BMC Infect Dis, 2022. **22**(1): p. 742.
164. Ebinger, J.E., et al., *Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2*. Nat Med, 2021. **27**(6): p. 981-984.
165. Cassaniti, I., et al., *Humoral and cell-mediated response against SARS-CoV-2 variants elicited by mRNA vaccine BNT162b2 in healthcare workers: a longitudinal observational study*. Clin Microbiol Infect, 2022. **28**(2): p. 301 e1-301 e8.
166. Van Elslande, J., et al., *IgG anti-spike antibody levels in healthcare workers with and without prior COVID-19 up to 3 months after BNT162b2 vaccination*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2022. **102**(4): p. 115638.
167. Callegaro, A., et al., *Antibody response to SARS-CoV-2 vaccination is extremely vivacious in subjects with previous SARS-CoV-2 infection*. J Med Virol, 2021. **93**(7): p. 4612-4615.
168. Skrzat-Klapaczynska, A., et al., *The Beneficial Effect of the COVID-19 Vaccine Booster Dose among Healthcare Workers in an Infectious Diseases Center*. Vaccines (Basel), 2022. **10**(4).

169. Munro, A.P.S., et al., *Safety, immunogenicity, and reactogenicity of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccines given as fourth-dose boosters following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 and a third dose of BNT162b2 (COV-BOOST): a multicentre, blinded, phase 2, randomised trial.* *Lancet Infect Dis*, 2022. **22**(8): p. 1131-1141.
170. Barin, B., et al., *Comparison of SARS-CoV-2 anti-spike receptor binding domain IgG antibody responses after CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1 COVID-19 vaccines, and a single booster dose: a prospective, longitudinal population-based study.* *Lancet Microbe*, 2022. **3**(4): p. e274-e283.
171. Deeba, E., et al., *Evaluation of S1RBD-Specific IgG Antibody Responses following COVID-19 Vaccination in Healthcare Professionals in Cyprus: A Comparative Look between the Vaccines of Pfizer-BioNTech and AstraZeneca.* *Microorganisms*, 2022. **10**(5).
172. Shrotri, M., et al., *Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1.* *Lancet*, 2021. **398**(10298): p. 385-387.
173. Sadarangani, M., A. Marchant, and T.R. Kollmann, *Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans.* *Nat Rev Immunol*, 2021. **21**(8): p. 475-484.
174. Israel, A., et al., *Large-Scale Study of Antibody Titer Decay following BNT162b2 mRNA Vaccine or SARS-CoV-2 Infection.* *Vaccines (Basel)*, 2021. **10**(1).
175. Egbert, E.R., et al., *Durability of Spike Immunoglobulin G Antibodies to SARS-CoV-2 Among Health Care Workers With Prior Infection.* *JAMA Netw Open*, 2021. **4**(8): p. e2123256.
176. Ebinger, J.E., et al., *Demographic and clinical characteristics associated with variations in antibody response to BNT162b2 COVID-19 vaccination among healthcare workers at an academic medical centre: a longitudinal cohort analysis.* *BMJ Open*, 2022. **12**(5): p. e059994.
177. Bayart, J.L., et al., *Waning of IgG, Total and Neutralizing Antibodies 6 Months Post-Vaccination with BNT162b2 in Healthcare Workers.* *Vaccines (Basel)*, 2021. **9**(10).
178. Levin, E.G., et al., *Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months.* *N Engl J Med*, 2021. **385**(24): p. e84.
179. den Hartog, G., et al., *Persistence of Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Relation to Symptoms in a Nationwide Prospective Study.* *Clin Infect Dis*, 2021. **73**(12): p. 2155-2162.
180. Horton, D.B., et al., *Determinants and Dynamics of SARS-CoV-2 Infection in a Diverse Population: 6-Month Evaluation of a Prospective Cohort Study.* *J Infect Dis*, 2021. **224**(8): p. 1345-1356.
181. Yan, X., et al., *Anti-SARS-CoV-2 IgG levels in relation to disease severity of COVID-19.* *J Med Virol*, 2022. **94**(1): p. 380-383.
182. Dan, J.M., et al., *Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection.* *Science*, 2021. **371**(6529).
183. Pagheh, A.S., et al., *SARS-COV-2 IgG specific antibodies persistence in recovered COVID-19 individuals and its association with severity and time of illness.* *New Microbes New Infect*, 2023. **52**: p. 101096.
184. Tober-Lau, P., et al., *Long-term immunogenicity of BNT162b2 vaccination in older people and younger health-care workers.* *Lancet Respir Med*, 2021. **9**(11): p. e104-e105.
185. Andrews, N., et al., *Duration of Protection against Mild and Severe Disease by Covid-19 Vaccines.* *N Engl J Med*, 2022. **386**(4): p. 340-350.
186. Menni, C., et al., *COVID-19 vaccine waning and effectiveness and side-effects of boosters: a prospective community study from the ZOE COVID Study.* *Lancet Infect Dis*, 2022. **22**(7): p. 1002-1010.
187. Kaura, A., et al., *Comparing the longer-term effectiveness of a single dose of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccines across the age spectrum.* *EClinicalMedicine*, 2022. **46**: p. 101344.
188. Hall, V., et al., *Protection against SARS-CoV-2 after Covid-19 Vaccination and Previous Infection.* *N Engl J Med*, 2022. **386**(13): p. 1207-1220.
189. Nguyen, N.N., et al., *SARS-CoV-2 Reinfection and Severity of the Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis.* *Viruses*, 2023. **15**(4).
190. Menegale, F., et al., *Evaluation of Waning of SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immunity: A Systematic Review and Meta-analysis.* *JAMA Netw Open*, 2023. **6**(5): p. e2310650.
191. Mohammed, H., et al., *A Systematic Review and Meta-Analysis on the Real-World Effectiveness of COVID-19 Vaccines against Infection, Symptomatic and Severe COVID-19 Disease Caused by the Omicron Variant (B.1.1.529).* *Vaccines (Basel)*, 2023. **11**(2).
192. Wu, N., et al., *Long-term effectiveness of COVID-19 vaccines against infections, hospitalisations, and mortality in adults: findings from a rapid living systematic evidence*

- synthesis and meta-analysis up to December, 2022*. Lancet Respir Med, 2023. **11**(5): p. 439-452.
193. Rahman, M.O., et al., *Protection of the third-dose and fourth-dose mRNA vaccines against SARS-CoV-2 Omicron subvariant: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open, 2023. **13**(12): p. e076892.
 194. Vassallo, A., et al., *Sex and Gender in COVID-19 Vaccine Research: Substantial Evidence Gaps Remain*. Front Glob Womens Health, 2021. **2**: p. 761511.
 195. Statistics Poland. *Human resources in selected health professions based on administrative sources in 2019-2020* 2022 [cited 2024 08/01]; Available from: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/zdrowie/zdrowie/zasoby-kadrowe-w-wybranych-zawodach-medycznych-na-podstawie-zrodel-administracyjnych-w-latach-2019-2020,28,1.html>.
 196. Republic of Poland. *Teachers by age, gender, entity type and provinces in 2020/2021 school year 2021* [cited 2024 08/01]; Available from: https://dane.gov.pl/pl/dataset/811,nauczyciele-w-osobach-i-etatach/resource/31197/table?page=1&per_page=20&q=&sort=.
 197. Brown, K.L., et al., *Estimating the heritability of SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 367.
 198. Ravikanth, V., et al., *A variant in TMPRSS2 is associated with decreased disease severity in COVID-19*. Meta Gene, 2021. **29**: p. 100930.
 199. Pairo-Castineira, E., et al., *GWAS and meta-analysis identifies 49 genetic variants underlying critical COVID-19*. Nature, 2023. **617**(7962): p. 764-768.
 200. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280 e8.

11. Załączniki

11.1. Opinia komisji bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 470/20

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 489); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo Farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 17 czerwca 2020 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr Paweł Zmora

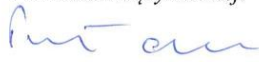
**Miejsce prowadzenia badań:
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

**Członkowie zespołu
badawczego: dr Paweł Zmora
dr Elżbieta Lenartowicz
mgr Dagny Lorent
mgr Rafał Nowak
mgr Katarzyna Ziółkowska
mgr Aleksandra Makarewicz
mgr Bartosz Zaremba**

**Temat badań:
„TMPRSS2 – potencjalny cel dla nowych leków oraz wyznacznik
przebiegu COVID19”.**

Okres prowadzenia badań: czerwiec 2020 r. – czerwiec 2023 r.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

11.2. Oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Poznań, 01.08.2024 r.

Mgr Dagny Lorent
Zakład Wirusologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Oświadczenie kandydata o wkładzie własnym w publikacje
wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

Tytuł publikacji: Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.

Autorzy: Dagny Lorent*, Rafał Nowak*, Carolina Roxo, Elżbieta Lenartowicz, Aleksandra Makarewicz, Bartosz Zaremba, Szymon Nowak, Łukasz Kuszel, Jerzy Stefaniak, Ryszard Kierzek, Paweł Zmora. *equal contribution

Czasopismo: *Vaccines*

Data opublikowania: 2021; 9(6):541.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: rekrutację uczestników badania, protokołowanie prób pobieranych do analiz i nadzór nad ich pobieraniem, przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Dawid Luwański, Magdalena Pisarska-Krawczyk, Magdalena Figlerowicz, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*

Data opublikowania: 2022; 10(10):1576.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Monika Jankowska, Łukasz Kuszel, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*.

Data opublikowania: 2023; 11(1):118.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Magdalena Figlerowicz, Luiza Handschuh, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*.

Data opublikowania: 2024; 12(5):475.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.


.....
Podpis kandydata

Poznań, 01.08.2024 r.

Dr Paweł Zmora
Zakład Wirusologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Oświadczenie autora korespondencyjnego o wkładzie kandydata w publikacje
wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

Tytuł publikacji: Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.

Autorzy: Dagny Lorent*, Rafał Nowak*, Carolina Roxo, Elżbieta Lenartowicz, Aleksandra Makarewicz, Bartosz Zaremba, Szymon Nowak, Łukasz Kuszel, Jerzy Stefaniak, Ryszard Kierzek, Paweł Zmora. *equal contribution

Czasopismo: *Vaccines*

Data opublikowania: 2021; 9(6):541.

Oświadczam, że wkład mgr Dagny Lorent w powstanie tej pracy obejmował: rekrutację uczestników badania, protokołowanie prób pobieranych do analiz i nadzór nad ich pobieraniem, przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Dawid Luwański, Magdalena Pisarska-Krawczyk, Magdalena Figlerowicz, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*

Data opublikowania: 2022; 10(10):1576.

Oświadczam, że wkład mgr Dagny Lorent w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Monika Jankowska, Łukasz Kuszel, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*.

Data opublikowania: 2023; 11(1):118.

Oświadczam, że wkład mgr Dagny Lorent w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.

Autorzy: Dagny Lorent, Rafał Nowak, Magdalena Figlerowicz, Luiza Handschuh, Paweł Zmora.

Czasopismo: *Vaccines*.

Data opublikowania: 2024; 12(5):475.

Oświadczam, że wkład mgr Dagny Lorent w powstanie tej pracy obejmował: przygotowywanie prób do badań, wykonywanie eksperymentów, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.













Podpis autora korespondencyjnego

11.3. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Article

Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Poznań, Poland, after the First Wave of the COVID-19 Pandemic

Dagny Lorent ^{1,†} , Rafal Nowak ^{1,†} , Carolina Roxo ¹ , Elzbieta Lenartowicz ¹ , Aleksandra Makarewicz ¹ ,
Bartosz Zaremba ¹ , Szymon Nowak ² , Lukasz Kuszel ³ , Jerzy Stefaniak ² , Ryszard Kierzek ¹
and Pawel Zmora ^{1,*} 

¹ Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland; dlorent@ibch.poznan.pl (D.L.); rnowak@ibch.poznan.pl (R.N.); croxo@ibch.poznan.pl (C.R.); elenartowicz@ibch.poznan.pl (E.L.); a.u.makarewicz@gmail.com (A.M.); bartosz1419@gmail.com (B.Z.); rkierzek@ibch.poznan.pl (R.K.)

² Department and Clinic of Tropical and Parasitic Diseases, Poznan University of Medical Sciences, 60-355 Poznan, Poland; snowak@ump.edu.pl (S.N.); tropiki@spsk2.pl (J.S.)

³ Department of Medical Genetics, Poznan University of Medical Sciences, 60-355 Poznan, Poland; kuszel@ump.edu.pl

* Correspondence: pzmora@ibch.poznan.pl

† These authors contributed equally to this article and share first authorship.



Citation: Lorent, D.; Nowak, R.; Roxo, C.; Lenartowicz, E.; Makarewicz, A.; Zaremba, B.; Nowak, S.; Kuszel, L.; Stefaniak, J.; Kierzek, R.; et al. Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Poznań, Poland, after the First Wave of the COVID-19 Pandemic. *Vaccines* **2021**, *9*, 541. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060541>

Academic Editors: Angelos Hatzakis and Dimitrios Paraskevis

Received: 29 April 2021

Accepted: 18 May 2021

Published: 21 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In comparison to other European countries, during the first months of the COVID-19 pandemic, Poland reported a relatively low number of confirmed cases of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections. To estimate the scale of the pandemic in Poland, a serosurvey of antibodies against SARS-CoV-2 was performed after the first wave of COVID-19 in Europe (March–May 2020). Within this study, we collected samples from 28 July to 24 September 2020 and, based on the ELISA results, we found that 1.67% (25/1500, 95% CI 1.13–2.45) of the Poznan (Poland) metropolitan area's population had antibodies against SARS-CoV-2 after the first wave of COVID-19. However, the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies was confirmed with immunoblotting in 56% (14/25) samples, which finally resulted in a decrease in seroprevalence, i.e., 0.93% (14/1500, 95% CI 0.56–1.56). The positive anti-SARS-CoV-2 IgG results were associated with age, occupation involving constant contact with people, travelling abroad, non-compliance with epidemiological recommendations and direct contact with the novel coronavirus. Our findings confirm the low SARS-CoV-2 incidence in Poland and imply that the population had little herd immunity heading into the second and third wave of the pandemic, and therefore, that herd immunity contributed little to preventing the high numbers of SARS-CoV-2 infections and COVID-19-related deaths in Poland during these subsequent waves.

Keywords: SARS-CoV-2; seroprevalence; antibodies; COVID-19; pandemic; Poland

1. Introduction

The emergence and rapid spread across the globe of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has affected almost every aspect of life. The SARS-CoV-2 virus can cause coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is manifested by non-specific symptoms, such as fever, cough, fatigue and rapid loss of taste and smell. The symptoms can range from mild to severe illness [1,2]. In some cases, the SARS-CoV-2 infection can be asymptomatic [3]. Due to the non-specific symptoms or asymptomatic course of novel coronavirus infection, the diagnosis is based on the detection of viral genetic material by the molecular techniques, i.e., reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) or loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [4,5]. Currently, the RT-PCR is a gold standard in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection due to its high sensitivity and specificity, internal controls of the reaction as well as the possibility of running many samples at once [6,7].

Based mostly on the RT-PCR results, from 1 January to 31 December 2020 the World Health Organization reported almost 81.5 million confirmed cases of SARS-CoV-2 infections and over 1.8 million deaths related to the virus worldwide [8,9]. The most affected countries with highest numbers of new SARS-CoV-2 infections and COVID-19 related deaths among European Union were Italy, Spain, France, Belgium and the UK [10,11]. At the same time, Poland was hit by “two waves” of the pandemic, i.e., from 10 March 2020 to 20 April 2020 and from 4 October 2020 to 27 December 2020, with 1.3 million confirmed SARS-CoV-2 infections and 28.5 thousand deaths caused by the novel coronavirus [12]. Due to the political decisions to test only symptomatic patients [12], nonspecific symptoms of COVID-19 [1,2], and asymptomatic SARS-CoV-2 infections [3], those numbers may be underestimated.

The aims of the present sero-epidemiological study were to estimate the prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in the population of the Poznań metropolitan area (Poland) after the first wave of the COVID-19 pandemic, to find the risk factors associated with COVID-19, and to compare the immunoassays used in detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Participants

We randomly selected and invited 1500 adult (over 18 years old) study participants from approximately 15,000 volunteers living in the Poznań metropolitan area, Poland, who answered the online epidemiological survey. The web-based survey was opened for 5 days, i.e., 18–23 July 2020, and broadly advertised in local and national newspapers, radio, TV, web portals as well as social media. Demographic data, including age, gender and occupation of each participant, were collected. Additionally, we asked volunteers about their current health status, potential flu-like symptoms in the last nine months and behavior during the COVID-19 pandemic, namely compliance with epidemiological recommendations. To estimate the severity of an individual’s flu-like symptoms, we developed a scoring system based on subjects’ self-assessment answers. If the patient did not show any symptoms, a value of 0 was assigned. Each symptom, such as fever, cough, runny nose, fatigue, muscle and joint pain, sore throat, headache, diarrhea and loss of smell or taste, was rated as 1, and hospitalization due to the flu-like symptoms was rated as 5. Additionally, the study participants were asked to compare flu-like symptoms in the last nine months before the serological test to flu-like symptoms in the previous years. Symptoms of flu-like illness in the last nine months that were milder than those experienced in the past were graded as 0, symptoms of the same severity were graded as 3, and more severe symptoms as 5. Based on the total sum of values of individual responses, study participants were divided into four groups: “asymptomatic” (0 points), “mild” (1–5 points), “moderate” (6–14 points) or “severe” (15–24 points). A similar classification approach was implemented to assess individuals’ compliance with epidemiological recommendations. If the study participant did not follow any recommendations, a value of 0 was assigned. Each of the preventive measures, such as face mask use, disinfection and social distance, remote work, avoiding contact with other people, and avoiding the use of public transport, was rated as 1. Depending on the total sum of values of individual responses, study participants were divided into three groups: “non-compliant” (0 points), compliant “at some point” (1–2 points) and compliant “in general” (3–4 points) with epidemiological recommendations.

2.2. Laboratory Analysis

The blood samples were collected from individuals from 28 July 2020 to 24 September 2020 (Figure S1) at the Wielkopolskie Centrum Medycyny Podróży, Poznan, and transferred to the IBCH PAS for analysis of anti-SARS-CoV-2 antibodies presence. In case of ELISA positive results for the presence of anti-SARS-CoV-2 IgA or borderline results for the anti-SARS-CoV-2 IgG, the study participants were asked to come again within 2–3 weeks and a blood collection as well as an ELISA analysis were repeated. For five study participants

with anti-SARS-CoV-2 IgG-positive results, we did the follow-up analysis at 10 weeks after the first test.

The presence of IgA and IgG antibodies against SARS-CoV-2 was determined using anti-SARS-CoV-2 IgA ELISA (EuroImmun) or anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA (EuroImmun) assays, respectively. The chosen immunoassays recognized specific anti-SARS-CoV-2 antibodies against the spike (S) protein and, according to Beavis and colleagues [13], demonstrate good and excellent specificity for IgA and IgG antibodies, respectively. All anti-SARS-CoV-2 IgG positive-samples were confirmed with quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG immunoblot (Polycheck), which uses the S protein and phosphorylated nucleocapsid protein (PNC) as antigens.

2.3. Statistical Analysis

The categorical variables were presented as counts and percentages, and the seroprevalence estimates were presented together with 95% CI. The 95% CI of the seroprevalence was calculated using the hybrid Wilson/Brown method. The differences between groups were analyzed with Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests. All statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 9 software.

2.4. Ethics Approval

The study was approved by the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20 from 17 June 2019). In addition, written informed consent was obtained from 1500 study participants before blood collection.

3. Results

3.1. Characteristics of Study Participants

The study group included 1500 adults without any flu-like symptoms at the sampling time and consisted of 896 (59.7%) female and 604 (40.3%) male subjects at a mean age of 38.7 ± 12.7 years old (Table 1). Within the group of volunteers, 964 (64.2%) did not report any chronic diseases, while 536 (35.8%) study participants were treated due to the chronic diseases, such as hypertension, asthma, Crohn disease, rheumatoid arthritis, diabetes or depression. (Table 2). In the last 9 months before the serological tests, 1240 (82.7%) study participants reported flu-like symptoms, i.e., fever, cough, fatigue, muscle and joint pain, etc. (Table 2), mostly with mild (454/1240, 36.6%) and moderate (720/1240, 58.1%) severity. In addition, 356 (23.7%) of volunteers with flu-like symptoms in the 9 last months before blood collection, or with potential contact with a SARS-CoV-2 infected person, were tested for the presence of SARS-CoV-2, and 7 (1.9%) received a positive result (Table 1). Most of the study participants (96.9%) followed the epidemiological recommendations, i.e., wearing a mask covering the nose and mouth, maintaining social distance and regularly disinfecting hands. Only 40 (2.7%) individuals had known contact with a SARS-CoV-2 infected person, while the majority, i.e., 1085 (72.3%) study participants, had not known about such situations (Table 3).

Table 1. Prevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Poznań metropolitan area.

Category	Participants	ELISA		Immunoblot	
		Positive Results	Seroprevalence (95% CI)	Positive Results	Seroprevalence (95% CI)
		Overall			
	1500	25	1.67% (1.13–2.45)	14	0.93% (0.56–1.56)

Table 1. Cont.

Category	Participants	ELISA		Immunoblot	
		Positive Results	Seroprevalence (95% CI)	Positive Results	Seroprevalence (95% CI)
Gender					
Female	896	14	1.56% (0.93–2.60)	8	0.89% (0.45–1.75)
Male	604	11	1.82% (1.02–3.23)	6	0.99% (0.46–2.15)
Age					
18–33	623	10	1.61% (0.87–2.92)	5	0.80% (0.34–1.87)
34–49	606	11	1.82% (1.02–3.22)	7	1.16% (0.56–2.37)
50–65	194	2	1.03% (0.18–3.68)	0	0.00% (0.00–1.94)
65+	77	2	2.60% (0.46–8.99)	2	2.60% (0.46–8.99)
Test for the SARS-CoV-2 presence					
Positive	7	3	42.86% (15.82–74.95)	3	42.86% (15.82–74.95)
Negative	349	8	2.29% (1.17–4.46)	6	1.72% (0.79–3.70)
Not tested	1144	14	1.22% (0.73–2.04)	5	0.44% (0.19–1.02)

Table 2. Anti-SARS-CoV-2 seroprevalence related to health status and severity of last flu-like illness.

Category	Participants	ELISA		Immunoblot	
		Positive Results	Seroprevalence (95% CI)	Positive Results	Seroprevalence (95% CI)
Chronic diseases					
None	964	16	1.66% (1.02–2.70)	11	1.14% (0.64–2.03)
CS-CDs	185	1	0.54% (0.03–3.00)	1	0.54% (0.03–3.00)
RS-CDs	78	3	3.85% (1.05–10.71)	0	0.00% (0.00–4.69)
I-CDs	8	0	0.00% (0.00–32.44)	0	0.00% (0.00–32.44)
CKD	1	0	0.00% (0.00–94.87)	0	0.00% (0.00–94.87)
DT-CDs	23	0	0.00% (0.00–14.31)	0	0.00% (0.00–14.31)
A-CDs	170	4	2.35% (0.90–5.76)	1	0.59% (0.03–3.26)
NeoD	5	0	0.00% (0.00–43.45)	0	0.00% (0.00–43.45)
MetD	50	1	2.00% (0.10–10.50)	1	2.00% (0.10–10.50)
MentD	29	0	0.00% (0.00–11.70)	0	0.00% (0.00–11.70)

Table 2. Cont.

Category	Participants	ELISA		Immunoblot	
		Positive Results	Seroprevalence (95% CI)	Positive Results	Seroprevalence (95% CI)
Severity of flu-like illness in the last 9 months before serological tests					
No symptoms	260	8	3.08% (1.57–5.95)	5	1.92% (0.82–4.42)
Mild	454	5	1.10% (0.42–2.30)	4	0.88% (0.34–2.24)
Moderate	720	12	1.67% (0.96–2.89)	5	0.69% (0.30–1.62)
Severe	66	0	0.00% (0.00–5.50)	0	0.00% (0.00–5.50)

CDs—chronic diseases; CS-CDs—circulatory system CDs, i.e., hypertension; RS-CDs—respiratory system CDs, i.e., asthma; I-CDs—infectious CDs, i.e., HIV/AIDS; CKD—chronic kidney disease; DT-CDs—digestive track CDs, i.e., Crohn disease; A-CDs—autoimmunological chronic diseases, i.e., allergies; NeoD—neoplasmatic diseases, i.e., cancer; MetD—metabolic diseases, i.e., diabetes; MentD—mental disorders, i.e., depression.

Table 3. SARS-CoV-2 infection risk factors.

Category	Participants	ELISA		Immunoblot	
		Positive Results	Seroprevalence (95% CI)	Positive Results	Seroprevalence (95% CI)
Occupation involving constant contact with people (i.e., physicians, nurses, shop assistants, civil servants)					
Yes	749	11	1.47% (0.82–2.61)	9	1.20% (0.63–2.27)
No	751	14	1.86% (1.11–3.11)	5	0.67% (0.29–1.55)
Travelling abroad					
Yes	574	16	2.93% (1.81–4.70)	8	1.46% (0.74–2.86)
No	953	9	0.94% (0.50–1.78)	6	0.63% (0.29–1.37)
Compliance with epidemiological recommendations (i.e., remote work, wearing a mask covering nose and mouth, avoiding contact with other people, avoiding the use of public transport)					
No	46	1	2.17% (0.11–11.33)	1	2.17% (0.11–11.34)
At some point	405	6	1.48% (0.68–3.19)	4	0.99% (0.39–2.51)
Yes, in general	1049	18	1.72% (1.09–2.70)	9	0.86% (0.45–1.62)
Known contact with SARS-CoV-2 infected person					
Yes	40	2	5.00% (0.85–15.79)	2	5.00% (0.89–16.50)
No	375	7	1.87% (0.91–3.80)	5	1.33% (0.57–3.08)
Not known	1085	16	1.47% (0.91–2.38)	7	0.65% (0.31–1.33)

3.2. Anti-SARS-CoV-2 Seroprevalence

In total, 25 of 1500 (1.67%) collected samples were found to be positive for anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies by the ELISA (Table 1). Simultaneously, 60 of 1500 (4.0%) collected samples were found to be positive for anti-SARS-CoV-2 IgA antibodies, but, in all of those cases, we did not observe IgA to IgG seroconversion (data not shown). There were no significant differences in seroprevalence between the weeks when the blood was collected (data not shown). We did not observe significant differences in the seroprevalence within

gender (Table 1). The differences in the anti-SARS-CoV-2 antibodies presence were found among groups at different ages (Table 1) and with different health status (Table 2). Based on the ELISA results, the highest seropositivity was found among people over 65 years old, and among study participants with chronic diseases of the respiratory system (Table 2).

Antibodies against the novel coronavirus were found in only three (42.9%) and eight (2.3%) study participants with positive and negative PCR-based test results, respectively. We found anti-SARS-CoV-2 antibodies in 14 samples from volunteers previously not tested with PCR or antigen tests (Table 1). Additionally, we found that among the tested study participants, 8/25 (35%) of SARS-CoV-2 infections followed an asymptomatic course (Table 2).

3.3. SARS-CoV-2 Infection Risk Factors

One of the highest anti-SARS-CoV-2 IgG seroprevalence rates was found among study participants who travelled abroad in the last 9 months before serological tests (Table 3). Others were individuals who did not follow epidemiological recommendations and persons who had direct contact with SARS-CoV-2 (Table 3). Based on the ELISA results, we did not find significant differences in the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies between individuals working in different roles.

3.4. Comparison of ELISA and Immunoblot Methods of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Detection

The presence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies was confirmed with immunoblotting in 14 of 25 samples (56%) (Table 1). For most analyzed parameters, the trend in the anti-SARS-CoV-2 seropositivity was not changed, i.e., based on the immunoblot, study participants over 65 years old, individuals who did not follow the epidemiological recommendations and people with direct contact with SARS-CoV-2 were characterized with highest seroprevalence (Tables 1–3). At the same time, the immunoblot analysis revealed that there are significant differences in the seroprevalence between individuals whose occupation involved constant contact with other people, e.g., physicians, nurses, shop assistants and civil servants (Table 3). The ELISA false positive results were found mostly among study participants between 18 and 33 years old (Table 1), as well as among volunteers with chronic diseases of the autoimmunological and respiratory systems (Table 2).

3.5. Anti-SARS-CoV-2 Antibody Levels

With quantitative immunoblots, we were able not only to confirm the ELISA results, but also to analyze the levels of anti-SARS-CoV-2 phosphorylated nucleoprotein (PNC) and anti-SARS-CoV-2 spike (S) antibodies. We found different levels of analyzed antibodies among study participants, as shown in Figure 1a. In addition, the anti-SARS-CoV-2 PNC and anti-SARS-CoV-2 S antibody levels differed within the same samples. Due to the low number of positive individuals, we did not correlate the antibody levels with previously mentioned parameters, i.e., age and gender.

With five study participants, we performed follow-up study and analyzed the level of anti-SARS-CoV-2 antibodies at 10 weeks after the first blood collection. As shown in Figure 1b, we did not observe any significant differences, but in 4 of 5 samples we reported slight decrease in the antibody level. For one sample, we found an increase in anti-SARS-CoV-2 S antibody levels (Figure 1b).

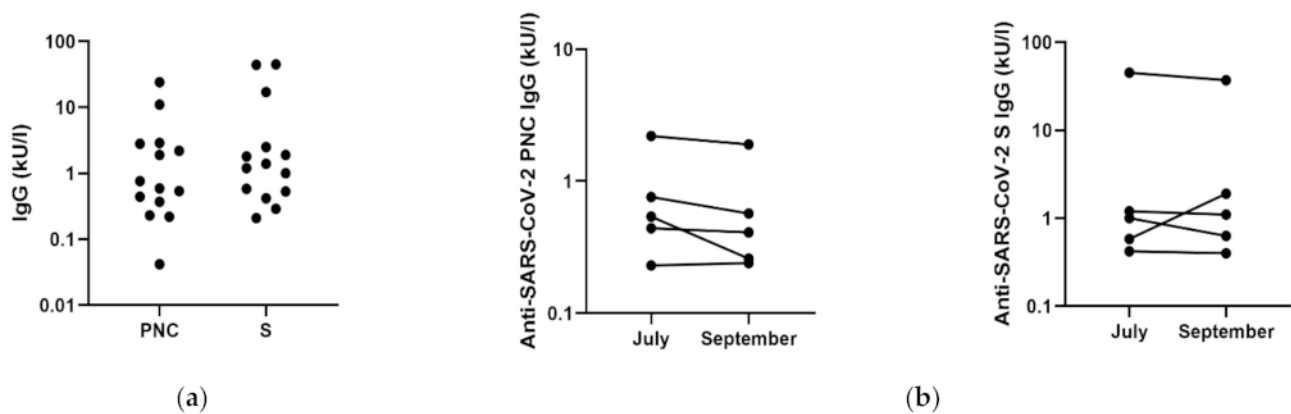


Figure 1. Anti-SARS-CoV-2 antibody levels among volunteers. (a) The total levels of anti-SARS-CoV-2 phosphorylated nucleoprotein (PNC) and anti-SARS-CoV-2 spike (S) antibodies among study participants ($N = 14$). (b) The changes in the anti-SARS-CoV-2 PNC (left) and anti-SARS-CoV-2 S (right) antibody levels within 10 weeks in five study participants. Each dot represents a single study participant.

4. Discussion

For many months, the reported novel coronavirus infection cases and COVID-19-related mortality in Poland were among the lowest in Europe [8,9,11,12]. For example, on 1 October 2020, there were 2469.99 confirmed SARS-CoV-2 cases and 67.20 COVID-19-related deaths per one million citizens, but, at the same time, in Spain and Germany there were 16,652.99 and 3527.39 confirmed infections and 683.84 and 113.49 deaths per one million citizens, respectively [8,9]. Those differences may be explained by the early implementation of public health measures in Poland, such as the closing of primary schools and the so-called deep lockdown in March and April 2020, just after the first confirmed SARS-CoV-2 infections. In addition, the discrepancies in the novel coronavirus cases between Poland and other comparable European Union members may result from the number of performed diagnostic tests. For example, at the beginning of October 2020, an average of 22,125 tests were performed per day in Poland. In comparison, there were 679,134 and 1,123,823 tests performed daily in Spain and Germany, respectively [14]. Finally, the differences in pandemic scale between Poland and other countries may be due to the political decisions to test only symptomatic patients [12] and the lack of free tests for the presence of novel coronavirus for the general population. This excludes individuals with asymptomatic SARS-CoV-2 infection from official statistics and does not prevent emergence of new epidemic foci, since the asymptomatic SARS-CoV-2 infected persons still can infect others [3,15,16]. Furthermore, according to our results, as well as data presented by others, the asymptomatic rate can range from 20% to up to 80% [17,18]. All of the above-mentioned reasons may cause the official numbers of SARS-CoV-2 infections to be underestimated.

Estimation of the scale of the COVID-19 pandemic, as well as objective comparison of different populations, can be achieved through sero-epidemiological studies. Our data demonstrates low (0.93%) seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the general population of the Poznan metropolitan area. Poznan is one of the biggest cities in Poland with almost one million inhabitants and, therefore, may represent the situation in other large Polish metropolitan areas, which, in total, represent approximately 30% of the society. However, it should be noted that the seroprevalence can differ in smaller cities and villages, due to, among other factors, the lower access to the health care system and diagnostic centers, as shown by others [19,20]. Based on our results of anti-SARS-CoV-2 seroprevalence, i.e., 0.93%, and demographic data, i.e., data on 3.5 million citizens as well as the numbers of confirmed SARS-CoV-2 infections presented by the Polish Ministry of Health, we calculated that in September 2020, just before the so-called second wave of the pandemic, approximately four-fold more infections occurred than were reported by the government, i.e., 32,550 SARS-CoV-2 infections based on seroprevalence vs. 7985 COVID-19 cases from

official statistics. These discrepancies may result from asymptomatic SARS-CoV-2 infection, as mentioned above, as well as reluctance to undergo diagnostic coronavirus testing, which is potentially linked with a mandatory 10-day period of quarantine. The hesitation in testing might result from the lack of trust towards healthcare workers among the general population in Poland. Based on YouGov data, in the context of the ongoing pandemic, the Polish population exhibits higher levels of trust towards family and friends, in contrast to other European nations, who ranked medical experts as the most trusted [21].

In comparison to Poznan, the anti-SARS-CoV-2 seroprevalence at similar time points, in other metropolitan cities, was higher, i.e., in Madrid, Spain, it was equal to 13.6% [22], in Geneva, Switzerland, it was 10.8% [23], and in Tehran, Iran, it was 16.3% [20]. This situation ensured that as of September 2020, the Polish population remained largely immunologically naïve to the virus. The low seroprevalence in Poland also highlights the importance of the vaccination against COVID-19. It is estimated that the spread and transmission of SARS-CoV-2 will be stopped with 60–70% of the population being vaccinated [24]. It is impossible and extremely dangerous to reach this level of herd immunity through SARS-CoV-2 infections.

In addition to estimating the percentage of Poznan metropolitan area citizens that underwent novel coronavirus infection, we also found the SARS-CoV infection risk factors in the wider Polish population. Namely, contact with SARS-CoV-2 infected individuals, age over 65 years, non-compliance with epidemiological recommendations, travelling abroad, and having an occupation involving constant contact with people (i.e., physicians and nurses), are linked with higher seroprevalence. Our data confirmed previously published results [19,25].

Moreover, it should be noted that besides its many strengths, such as the relatively large group of study participants and the use of two independent techniques for anti-SARS-CoV-2 antibody detection, our study has some limitations. First of all, we observed overrepresentation of women in the study, i.e., 59.7% vs. 51.5% in the Polish population, probably due to higher willingness to participate in online surveys [26]. However, since we did not detect significant differences in the seroprevalence among gender, this fact should not bias the final results. In addition, individuals travelling abroad were also overrepresented in the study. According to the Polish Tourism Organisation, 54% of the Polish population travelled for the purposes of vacation in 2019, and 18.3% of them travelled abroad [27]. This fact may lead to some bias and overestimation of seroprevalence. On the other hand, there is underrepresentation of study participants over 65, i.e., 5.1% vs. 22% in Polish society. This fact can be explained by the use of an online survey and the problems encountered by older people when using modern technology [28]. In addition, there were many volunteers who wanted to participate, but due to the COVID-19 pandemic, high risk of severe COVID-19 in this age group, and the recommendation to stay at home and isolate from others, they cancelled the meetings and were replaced by the next random person from the list. Finally, our results can be biased due to the sensitivity and specificity of serological tests. Currently, it was published that many serological tests, including the EuroImmune ELISA used in our study, cannot detect the anti-SARS-CoV-2 antibodies at low levels, which is characteristic for so-called non-responders [29]. This might explain why we did not detect the antibodies in 4 of 7 study participants with positive results in the RT-PCR test. The problem with specificity of serological tests was also observed by us in the case of anti-SARS-CoV-2 IgA antibodies. In all cases of individuals with positive results for IgA antibodies, we did not observe seroconversion. The false positive results of the presence of IgA antibodies were mostly correlated with allergies, which was not described by the manufacturer. It should be also highlighted that ELISA is a very good screening method, but the results should be confirmed by immunoblot. As shown in our study for the first time, the ELISA false positive signals can be as high as almost 50% of all positive results.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study which demonstrates the anti-SARS-CoV-2 antibody seroprevalence in the general population in Poland after the first wave of the COVID-19 pandemic. Our findings confirm that the low SARS-CoV-2 incidence in Poland is probably due to the effectiveness of early countermeasures. However, based on the seroprevalence of 0.93%, it should be noted that the official numbers of novel coronavirus infections were underestimated and that approximately four-fold more infections occurred than were reported by the Polish Ministry of Health. The low anti-SARS-CoV-2 seroprevalence implies that the population had little herd immunity heading into the second and third wave of the pandemic, and therefore, that herd immunity contributed little to preventing the high numbers of SARS-CoV-2 infections and COVID-19-related deaths in Poland during these subsequent waves. Finally, taking into account all above-mentioned limitations of our study, the obtained seroprevalence may be underestimated. Therefore, further studies on the SARS-CoV-2 burden in Poland are needed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines9060541/s1>, Figure S1. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 related deaths in Poland during the COVID-19 pandemic. Data collected and published online by Michal Rogalski. Blue marks the time of blood collection from study participants in Poznan metropolitan area.

Author Contributions: Conceptualization, P.Z.; methodology, P.Z., S.N. and J.S.; investigation, D.L., R.N., C.R., E.L., A.M. and B.Z.; resources, L.K.; Writing—Original draft preparation, D.L., R.N. and P.Z.; Writing—Review and Editing, P.Z.; visualization, P.Z.; supervision, R.K. and P.Z.; funding acquisition, P.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Science Centre (Poland), grant number UMO-2020/01/0/NZ6/00152.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20, 17 June 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The authors would like to thank Aleksandra Jarmołowicz and Julia Jabłońska from the Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, for their help with contacting volunteers by phone. In addition, the authors are grateful to Katarzyna Wysocka and Danuta Kuczmńska from Wielkopolskie Centrum Medycyny Podróży for their assistance with blood sample collection.

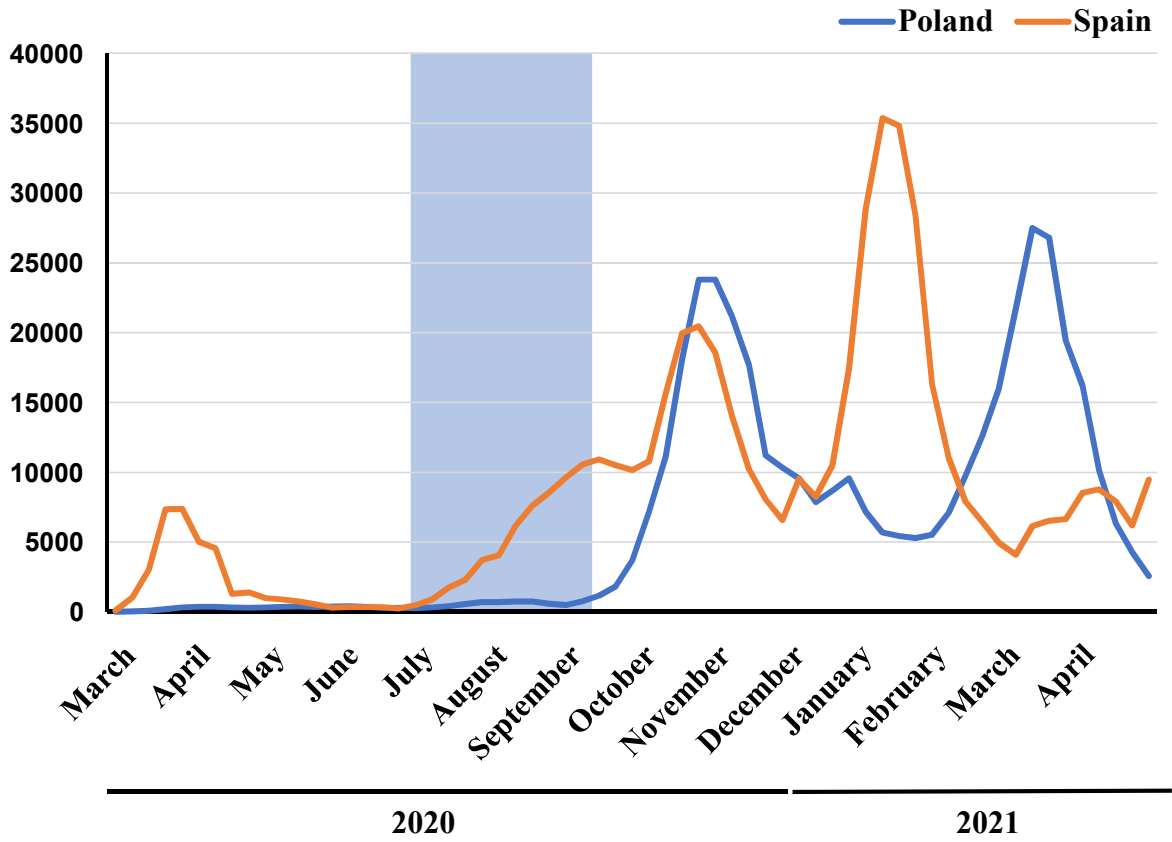
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baj, J.; Karakuła-Juchnowicz, H.; Teresiński, G.; Buszewicz, G.; Ciesielka, M.; Sitarz, E.; Forma, A.; Karakuła, K.; Flieger, W.; Portincasa, P.; et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1753. [[CrossRef](#)]
2. Bar-On, Y.M.; Flamholz, A.; Phillips, R.; Milo, R. Sars-cov-2 (Covid-19) by the numbers. *Elife* **2020**, *9*, e57309. [[CrossRef](#)]
3. Nikolai, L.A.; Meyer, C.G.; Kremsner, P.G.; Velavan, T.P. Asymptomatic SARS Coronavirus 2 infection: Invisible yet invincible. *Int. J. Inf. Dis.* **2020**, *100*, 112–116. [[CrossRef](#)]
4. Kubina, R.; Dziedzic, A. Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics* **2020**, *10*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pang, J.; Wang, M.X.; Ang, I.Y.H.; Tan, S.H.X.; Lewis, R.F.; Chen, J.I.-P.; Gutierrez, R.A.; Gwee, S.X.W.; Chua, P.E.Y.; Yang, Q.; et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dramé, M.; Tabue Tegu, M.; Proye, E.; Hequet, F.; Hentzien, M.; Kanagaratnam, L.; Godaert, L. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 2312–2313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Boeger, B.B.; Fachi, M.M.; Vilhena, R.O.; Cobre, A.F.; Tonin, F.S.; Pontarolo, R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am. J. Inf. Control.* **2021**, *49*, 21–29. [[CrossRef](#)]
8. WHO | World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/> (accessed on 14 May 2021).

9. Dong, E.; Du, H.; Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Inf. Dis.* **2020**, *20*, 533–534. [CrossRef]
10. Gabutti, G.; D'anchera, E.; De Motoli, F.; Savio, M.; Stefanati, A. The epidemiological characteristics of the covid-19 pandemic in europe: Focus on Italy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2942. [CrossRef]
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en> (accessed on 14 May 2021).
12. Polish Ministry of Health. Available online: <https://www.gov.pl/web/zdrowie> (accessed on 14 May 2021).
13. Beavis, K.G.; Matushek, S.M.; Abeleda, A.P.F.; Bethel, C.; Hunt, C.; Gillen, S.; Moran, A.; Tesic, V. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J. Clin. Virol.* **2020**, *129*, 104468. [CrossRef]
14. Coronavirus Pandemic (COVID-19)—The Data—Statistics and Research—Our World in Data. Available online: <https://ourworldindata.org/coronavirus-data> (accessed on 14 May 2021).
15. Qiu, X.; Nergiz, A.I.; Maraolo, A.E.; Bogoch, I.I.; Low, N.; Cevik, M. The role of asymptomatic and pre-symptomatic infection in SARS-CoV-2 transmission—A living systematic review. *Clin. Microbiol. Inf.* **2021**, *27*, 511–519. [CrossRef]
16. Pollock, A.M.; Lancaster, J. Asymptomatic transmission of covid-19. What we know, and what we don't. *BMJ* **2020**, *371*, m4851. [CrossRef]
17. Nishiura, H.; Kobayashi, T.; Miyama, T.; Suzuki, A.; Jung, S.-M.; Hayashi, K.; Kinoshita, R.; Yang, Y.; Yuan, B.; Akhmetzhanov, A.R.; et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int. J. Inf. Dis.* **2020**, *94*, 154–155. [CrossRef]
18. Oran, D.P.; Topol, E.J. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Ann. Intern. Med.* **2020**, *173*, 362–367. [CrossRef] [PubMed]
19. Rogawski McQuade, E.T.; Guertin, K.A.; Becker, L.; Operario, D.; Gratz, J.; Guan, D.; Khan, F.; White, J.; McMurry, T.L.; Shah, B.; et al. Assessment of Seroprevalence of SARS-CoV-2 and Risk Factors Associated With COVID-19 Infection among Outpatients in Virginia. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2035234. [CrossRef] [PubMed]
20. Poustchi, H.; Darvishian, M.; Mohammadi, Z.; Shayanrad, A.; Delavari, A.; Bahadorimonfared, A.; Eslami, S.; Javanmard, S.H.; Shakiba, E.; Somi, M.H.; et al. SARS-CoV-2 antibody seroprevalence in the general population and high-risk occupational groups across 18 cities in Iran: A population-based cross-sectional study. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 473–481. [CrossRef]
21. COVID-19 Public Monitor | YouGov. Available online: <https://yougov.co.uk/covid-19> (accessed on 14 May 2021).
22. Pollán, M.; Pérez-Gómez, B.; Pastor-Barriuso, R.; Oteo, J.; Hernán, M.A.; Pérez-Olmeda, M.; Sanmartín, J.L.; Fernández-García, A.; Cruz, I.; Fernández de Larrea, N.; et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): A nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* **2020**, *396*, 535–544. [CrossRef]
23. Stringhini, S.; Wisniak, A.; Piumatti, G.; Azman, A.S.; Lauer, S.A.; Baysson, H.; Ridder, D.D.; Petrovis, D.; Schrempft, S.; Marcus, K.; et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): A population-based study. *Lancet* **2020**, *396*, 313–319. [CrossRef]
24. Anderson, R.M.; Vegvari, C.; Truscott, J.; Collyer, B.S. Challenges in creating herd immunity to SARS-CoV-2 infection by mass vaccination. *Lancet* **2020**, *396*, 1614–1616. [CrossRef]
25. Booth, A.; Reed, A.B.; Ponzio, S.; Yassaee, A.; Aral, M.; Plans, D.; Labrique, A.; Mohan, D. Population risk factors for severe disease and mortality in COVID-19: A global systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0247461. [CrossRef]
26. Holdcroft, A. Gender bias in research: How does it affect evidence based medicine? *J. R. Soc. Med.* **2007**, *100*, 2–3. [CrossRef] [PubMed]
27. Polish Tourism Organisation. Available online: <https://www.pot.gov.pl/en> (accessed on 14 May 2021).
28. Vaportzis, E.; Clausen, M.G.; Gow, A.J. Older adults perceptions of technology and barriers to interacting with tablet computers: A focus group study. *Front. Psychol.* **2017**, *8*, 1687. [CrossRef] [PubMed]
29. Eberhardt, K.A.; Dewald, F.; Heger, E.; Gieslmann, L.; Vanshylla, K.; Wirtz, M.; Kleipass, F.; Johannis, W.; Schommers, P.; Gruell, H.; et al. Evaluation of a New Spike (S)-Protein-Based Commercial Immunoassay for the Detection of Anti-SARS-CoV-2 IgG. *Microorganisms* **2021**, *9*, 733. [CrossRef] [PubMed]

Figure S1





Article

The Longitudinal Analysis on the Anti-SARS-CoV-2 Antibodies among Healthcare Workers in Poland—Before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 Vaccination

Dagny Lorent ¹, Rafał Nowak ¹, Dawid Luwański ², Magdalena Pisarska-Krawczyk ^{2,3},
Magdalena Figlerowicz ⁴ and Paweł Zmora ^{1,*}

¹ Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland

² Gynecology and Obstetrics Ward, District Hospital in Wrzesnia, 62-300 Wrzesnia, Poland

³ Department of Nursery, The President Stanislaw Wojciechowski Calisia University, 62-800 Kalisz, Poland

⁴ Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Poznan University of Medical Sciences, 61-701 Poznan, Poland

* Correspondence: pzmora@ibch.poznan.pl; Tel.: +48-61-852-8503

Abstract: One of the groups most vulnerable to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection is healthcare workers (HCWs) who have direct contact with suspected and confirmed coronavirus diseases 2019 (COVID-19) patients. Therefore, this study aimed to (i) conduct a longitudinal analysis of the seroprevalence of SARS-CoV-2 infection among HCWs working in two healthcare units (HCUs) in Poland and (ii) identify anti-SARS-CoV-2 IgG antibody (Ab) response factors following infection and anti-COVID-19 vaccination. The overall seroprevalence increased from 0% at baseline in September 2020 to 37.8% in December 2020. It reached 100% in February 2021 after BNT126b2 (Pfizer New York, NY, USA/BioNTech Mainz, Germany) full vaccination and declined to 94.3% in September 2021. We observed significant differences in seroprevalence between the tested high- and low-risk infection HCUs, with the highest seropositivity among the midwives and nurses at the Gynecology and Obstetrics Ward, who usually have contact with non-infectious patients and may not have the proper training, practice and personal protective equipment to deal with pandemic infections, such as SARS-CoV-2. We also found that anti-SARS-CoV-2 Ab levels after coronavirus infection were correlated with disease outcomes. The lowest Ab levels were found among HCWs with asymptomatic coronavirus infections, and the highest were found among HCWs with severe COVID-19. Similarly, antibody response after vaccination depended on previous SARS-CoV-2 infection and its course: the highest anti-SARS-CoV-2 Ab levels were found in vaccinated HCWs after severe COVID-19. Finally, we observed an approximately 90–95% decrease in anti-SARS-CoV-2 Ab levels within seven months after vaccination. Our findings show that HCWs have the highest risk of SARS-CoV-2 infection, and due to antibody depletion, extra protective measures should be undertaken. In addition, in the context of the emergence of new pathogens with pandemic potential, our results highlight the necessity for better infectious disease training and regular updates for the low infection risk HCUs, where the HCWs have only occasional contact with infectious patients.

Keywords: SARS-CoV-2; antibodies; healthcare workers; seroprevalence; vaccine; Poland



Citation: Lorent, D.; Nowak, R.; Luwański, D.; Pisarska-Krawczyk, M.; Figlerowicz, M.; Zmora, P. The Longitudinal Analysis on the Anti-SARS-CoV-2 Antibodies among Healthcare Workers in Poland—Before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 Vaccination. *Vaccines* **2022**, *10*, 1576. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101576>

Academic Editor:
Eduardo Gomez-Casado

Received: 28 July 2022
Accepted: 16 September 2022
Published: 20 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since the first reported case of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in December 2019 in Wuhan, China, the WHO has reported almost 597 million confirmed cases of novel coronavirus infections and 6.46 million deaths related to coronavirus diseases 2019 (COVID-19) [1]. One of the groups most vulnerable to SARS-CoV-2 infections is healthcare workers (HCWs) who have direct contact with suspected and confirmed COVID-19 patients [2–4]. The best way to prevent a novel coronavirus infection is

vaccination [5–10]. Safe and efficient COVID-19 vaccines were developed and approved by the U.S. Food and Drug Administration (Silver Spring, MD, USA) and the European Medicines Agency (Amsterdam, The Netherlands) in 2020 [11,12]. Since the healthcare system is the most crucial element in the fight against COVID-19 and depends completely on HCWs, the WHO recommended vaccinating HCWs during the first phase of vaccination campaigns [13].

The Polish vaccination strategy included four phases [14]. So called phase 0 included COVID-19 vaccination with two doses of BNT126b2 mRNA vaccine (Pfizer/BioNTech) restricted to the HCWs, medical students and social care workers. The first vaccines were administered in the last days of December 2020, and as of March 2021, most HCWs had been fully vaccinated. In phase 1, which started in mid-January 2021, COVID-19 vaccines were offered to elderly over 60 y.o., long-term care facilities residents and public service workers, i.e., teachers. During the next phase, individuals with comorbidities, as well as other essential workers might be vaccinated. Finally, in phase 3 the COVID-19 vaccine might be administered to each person older than 18 y.o. In phases 1–3, the following COVID-19 vaccines were available: BNT126b2 mRNA vaccine (Pfizer/BioNTech), mRNA-1273 (Moderna, Cambridge, MA, USA), AZD1222 (AstraZeneca, Cambridge, UK/Oxford University, Oxford, UK) and JNJ-78436735 (Janssen Pharmaceutical Companies, Beerse, Belgium). Depending on the current epidemiological situation and vaccine availability, the vaccination rollout was updated, with specific COVID-19 vaccines targeting particular groups, i.e., the AZD1222 with a 3-month time period between the doses was offered to the teachers. Up to date, approximately 57.8% of the Polish society was fully vaccinated [15], and the HCWs are one of the groups with the highest vaccination rate. It is estimated that approximately 93% of physicians, 90% of dentists, 92% of medical laboratory assistants, 90% of midwives and 89% of nurses administered at least two doses of the COVID-19 vaccine [16].

The BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine, developed by Pfizer and BioNTech, consists of nucleoside-modified mRNA encoding full-length SARS-CoV-2 spike (S) glycoprotein formulated in lipid nanoparticle composition. This vaccine showed high efficacy in preventing COVID-19 two and six months after the second vaccine dose, i.e., 95% [17] and 91.3% [18], respectively. However, it should be highlighted that vaccine protection is not endless and a reduction in effectiveness against COVID-19 and waning immunity with time was observed [19]. The seroprevalence of SARS-CoV-2 infection, as well as antibody response after COVID-19 vaccination among HCWs in Poland [20–22], as well as other countries [3,23,24] were analyzed by many research groups. The immune response to natural SARS-CoV-2 infection, as well as COVID-19 vaccination, is not fully understood.

Here, we present the antibody responses after natural SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination among HCWs from different healthcare units with different SARS-CoV-2 infection risks at four time points through one year.

This study aimed to (i) conduct a longitudinal analysis of the prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies among HCWs in Poland and (ii) identify anti-SARS-CoV-2 IgG antibody response factors following coronavirus infection and anti-COVID-19 vaccination.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants

We invited HCWs from several COVID-19 and non-COVID-19 hospital healthcare units (HCUs) in the Greater Poland region, Poland. Based on healthcare unit specificity, such as structure, size, and numbers of employees and patients, we included HCWs from the Department of Infectious Diseases and Child Neurology (DIDaCN), K. Jonscher's Clinical Hospital, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, and the Gynecology and Obstetrics Ward (GaOW), District Hospital, Wrzesnia, in the study. The HCWs were invited to participate in the project on a voluntary basis.

2.2. Study Design

All participants were asked to answer an online epidemiological survey to collect data on sex, age, profession, and previous SARS-CoV-2 RT-PCR test results. Additionally, HCWs with confirmed COVID-19 were questioned about the severity of their symptoms. Individual flu-like symptoms, e.g., fever, cough, runny nose, fatigue, and muscle and joint pain, were rated as mild to moderate, while participants who required hospitalization were classified as having a severe course of infection. HCWs who had not shown any flu-like symptoms in the last nine months before the analysis but had received positive results for an anti-SARS-CoV-2 ELISA were defined as asymptomatic.

Blood samples were collected from 90 individuals at either the DIDaCN or GOaW in September 2020 after the first wave of the COVID-19 pandemic; in December 2020 after the second wave of the COVID-19 pandemic; in February 2021, approximately two weeks after the second dose of the BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) vaccine; in September 2021 after the third wave of the COVID-19 pandemic and approximately seven months after vaccination (Supplementary Figure S1). At the last time point, 15 out of 90 enrolled individuals did not donate their blood since they did not show up and did not answer our contact attempts.

2.3. Laboratory Analysis

Before the COVID-19 vaccination, we determined the prevalence of SARS-CoV-2 infection using semi-quantitative anti-SARS-CoV-2 S IgG ELISA (EuroImmun GmbH, Lübeck, Germany). In addition, positive ELISA results were confirmed by quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG immunoblots (Polycheck; Biocheck GmbH, Münster, Germany), which detected the anti-SARS-CoV-2 spike (S) protein and nucleocapsid protein (NCP) antibodies. After COVID-19 vaccination, a quantitative analysis of anti-SARS-CoV-2 S antibody levels was performed using anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA IgG (EuroImmun GmbH) according to the manufacturer's instructions. Moreover, to analyze the SARS-CoV-2 seroprevalence after vaccination we used the anti-SARS-CoV-2 NCP IgG ELISA (EuroImmun GmbH), which detects anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies generated only after natural infection and not produced as a consequence of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. The semiquantitative anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA results were further confirmed by the quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG immunoblots (Polycheck, Biocheck GmbH).

2.4. Statistical Analysis

The categorical variables were presented as counts and percentages, and the seroprevalence estimates were presented with the 95% CI calculated using the hybrid Wilson/Brown method. The differences between the two groups were analyzed by the Mann–Whitney test. For the analysis of the seroprevalence at different time points, a repeated measures ANOVA with the Tukey post-hoc test was performed with HCUs as a between-subject factor and time of blood donation as a within-subject factor. Further analyses were conducted with two-way ANOVA with the Tukey post-hoc test with the following within-subject factors: sex (female, male); age (<30, 31–40, 41–50, 51–60, >60); occupation (physician, nurse/midwife, other); time after infection (3, 4, 5, etc.); COVID-19 course (asymptomatic, mild to moderate, severe), ELISA result before vaccination (negative, positive). The interaction between analyzed factors was not included. Data were accepted as statistically different if $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software.

2.5. Ethics Approval

The study was approved by the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20 from 17 June 2019). In addition, written informed consent was obtained from each study participant before blood collection.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Participants

The study group consisted of 90 HCWs from two HCUs in the Greater Poland region, i.e., 50 participants from the DIDaCN and 40 participants from the GaOW (Table 1). Most of the enrolled HCWs were female: 80% (n = 40) from the DIDaCN and 87.5% (n = 35) from the GaOW. Participants from the DIDaCN were aged 36.5 ± 10.8 years; 50% were nurses (n = 25), 32% were physicians (n = 16), and 18% were other employees (n = 9). Participants from the GaOW were aged 53 ± 10.6 years; 72.5% of them were midwives (n = 29), 15% were physicians (n = 6), and 12.5% were other employees (n = 5) (Table 1). At the time of enrolment, none of the HCWs had a history of COVID-19.

Table 1. Characteristic of the analyzed health facility units.

	DIDaCN ¹	GaOW ²
	HCWs	
Study participants	50	40
Female	40	35
Male	10	5
<30 y.o.	16	3
31–40 y.o.	13	2
41–50 y.o.	11	9
51–60 y.o.	9	20
>60 y.o.	1	6
Physicians	16	6
Nurses/Midwives	25	29
Others	9	5
	HCUs	
Hospital beds	20	28 + 3 ³
Admitted patients/month in 2020, mean	273	150
COVID-19 patients in 2020	292 + 2443 ⁴	3
SARS-CoV-2 infection risk	HIGH	LOW

¹ DIDaCN—Department of Infectious Diseases and Child Neurology; ² GaOW—Gynecology and Obstetrics Ward; ³ beds + delivery rooms; ⁴ confirmed + suspected cases.

Although the HCUs were located in two different cities in the Greater Poland region, i.e., Poznan and Wrzesnia, they were of a similar size with a similar number of employees (Table 1). The DIDaCN had 20 hospital beds and had admitted approximately 273 patients/month in 2020. The GaOW had 28 hospital beds and three delivery rooms and had admitted approximately 150 women/month in 2020. However, the HCUs differed significantly in the number of patients admitted with suspected/confirmed COVID-19 (Table 1). The GaOW only admitted three SARS-CoV-2 positive patients throughout 2020, while the DIDaCN admitted 292 confirmed and 2443 suspected COVID-19 patients in 2020. Due to suspected and confirmed contact with COVID-19 patients, we classified the DIDaCN as a high-risk SARS-CoV-2 infection work environment in contrast to the GaOW, which we defined as a low-risk infection environment (Table 1).

3.2. Prevalence of SARS-CoV-2 Infection among HCWs

At the time of enrolment (September 2020), none of the participants had a history of COVID-19, and this was confirmed by the ELISA results. We did not detect any anti-SARS-CoV-2 antibodies in any of the participants. However, over the following three months (October–December 2020), as a second wave of the pandemic affected Poland, total seroprevalence among the participants increased to 37.8% (95% CI 28.46–48.10). However, there were some differences between the HCUs: there were twice as many participants with anti-SARS-CoV-2 antibodies at the GaOW compared to the DIDaCN (Table 2). Based on the self-assessments of the ELISA-positive participants, we categorized six as having asymptomatic SARS-CoV-2 infection; 24 as having mild to moderate COVID-19 and three, who required hospitalization, as having severe COVID-19.

Table 2. The SARS-CoV-2 seroprevalence among the healthcare workers at different time points.

		Seroprevalence (95% CI)			
		September 2020	December 2020	February 2021	September 2021
Total	N	90	90	90	75
	anti-S	0% ^a (0.00–4.09)	37.8% ^b (28.46–48.10)	100% ^c (95.91–100)	89.3% ^d (80.34–94.50)
	anti-NCP	nd	nd	26.0% (18.41–35.37)	17.1% (10.28–27.10)
DIDaCN ¹	N	50	50	50	41
	anti-S	0% ^a (0.00–7.14)	26.0% ^b (15.87–36.55)	100% ^c (92.90–100)	85.40% ^c (71.56–93.12)
	anti-NCP	nd	nd	14.0% (6.95–26.19)	5.71% (1.02–18.61)
GaOW ²	N	40	40	40	34
	anti-S	0% ^a (0.00–8.76)	52.5% ^b (37.50–67.07)	100% ^c (91.24–100)	94.12% ^c (80.91–98.96)
	anti-NCP	nd	nd	38.00% (25.86–51.85)	26.83% (15.70–41.93)

¹ DIDaCN—Department of Infectious Diseases and Child Neurology; ² GaOW—Gynecology and Obstetrics Ward; N—number of participants; nd—not determined; ^{a, b, c, d}—values within a row with different superscript letters differ $p < 0.05$.

At the beginning of 2021, COVID-19 vaccines started to become available, and according to WHO recommendations, HCWs in Poland were vaccinated during the phase 0 of the vaccination campaign. After two doses of the BNT162b2 mRNA vaccine (Pfizer-BioNTech), anti-SARS-CoV-2 S antibodies were detected in all the study participants (Table 2). Due to the presence of antibodies against SARS-CoV-2 S after vaccination, we decided to further analyze the prevalence of SARS-CoV-2 infection based on the anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies.

In February 2021, we observed a significant decrease in the total prevalence of SARS-CoV-2 infection (Table 2), and anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies were found among 68.7% of previously ELISA-positive individuals. It should be highlighted that, simultaneously, none of the ELISA-negative individuals seroconverted and received positive results at this time. In addition, a significantly higher seroprevalence was observed among the GaOW participants compared to the DIDaCN participants (Table 2).

Within the next seven months (as of September 2021), we observed further depletion of anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies. In addition, the vaccination antibodies were completely depleted in some individuals, from both the DIDaCN and the GaOW. Similar to the previous observation, we only detected antibodies in previously ELISA-positive participants. None of the previously analyzed ELISA-negative participants were infected with SARS-CoV-2.

3.3. The SARS-CoV-2 Infection Risk Factors among HCWs

Based on the obtained seroprevalence results and the study participant's questionnaires we analyzed the impact of some general factors, such as sex, age, and profession on the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies. We did not observe any significant differences in the seroprevalence between females and males, as well as nurses/midwives and physicians (Table 3). Additionally, the seroprevalence in most age groups is similar, with one exception. Namely, the highest SARS-CoV-2 seroprevalence (51.7%, 95% CI 14.55–51.90) was found among study participants between 50 and 60 years old (Table 3).

Table 3. The SARS-CoV-2 infection risk factors during the second wave of the COVID-19 pandemic.

	Seroprevalence (95% CI)		
	Total	DIDaCN ¹	GaOW ²
Total	37.8% ^{ab} (28.46–48.10)	26% ^a (15.87–36.55)	52.5% ^b (37.50–67.07)
	Sex		
Female	37.3% (27.26–48.65)	22.5% (12.32–37.50)	54.3% (38.19–69.53)
Male	40.0% (19.82–64.25)	40% (16.82–68.73)	40% (7.11–76.93)
	Age		
<30	21.0% (8.51–43.33)	25% (10.18–49.49)	0% (0.00–56.15)
31–40	40.0% (19.82–64.25)	30.8% (12.68–57.63)	100% (17.77–100)
41–50	30.0% (14.55–51.90)	27.2% (9.75–56.57)	33.3% (12.06–64.58)
51–60	51.7% (34.43–68.61)	22.2% (3.95–54.74)	65% (43.29–81.88)
>60	42.9% (15.82–74.95)	0% (0.00–94.87)	50% (18.76–81.24)
	Occupation		
Physicians	36.4% (19.73–57.05)	31.3% (14.17–55.60)	50% (18.76–81.24)
Nurses/midwives	44.4% ^{ab} (32.00–57.62)	24% ^a (11.50–43.43)	62.1% ^b (44.00–77.31)
Others	14.3% (2.54–39.94)	22.2% (3.95–54.74)	0% (0.00–43.45)

¹ DIDaCN—Department of Infectious Diseases and Child Neurology; ² GaOW—Gynecology and Obstetrics Ward; ^{a, b}—values within a row with different superscript letters differ $p < 0.05$.

In addition, we analyzed the SARS-CoV-2 infection risk factors in high- and low-infection risk environments. At the DIDaCN, we found the highest seropositivity for participants working as physicians (31.3%, 95% CI 14.17–55.60), followed by nurses (24%, 95% CI 11.50–43.43) and other employees (22.2%, 95% CI 3.95–54.74). Among the GaOW's medical personnel, the occupation group with the highest seropositivity included nurses/midwives (62.1%, 95% CI 44.00–77.31%), followed by physicians (50%, 95% CI 18.76–81.24%). Note, that nurses and midwives from the GaOW had 2.5 times higher seropositivity than those from the DIDaCN.

Since no new SARS-CoV-2 infections among HCWs were not observed after the second pandemic wave and COVID-19 vaccination, we did not analyze the infection risk factors at later time points.

3.4. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Level after the Infection

The anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels varied widely across the participants, ranging from 0.73 to 139 kU/L for anti-S and from 0.73 to 119 kU/L for anti-NCP. In addition, we did not observe any correlation between anti-S and anti-NCP antibody levels (data not shown). For all the participants, there were no significant differences in the anti-SARS-CoV-2 IgG S or NCP antibody levels by sex, age, or time after infection (Figure 1a–c). However, we found that the anti-SARS-CoV-2 IgG levels after coronavirus infection were correlated with the disease course. For both anti-SARS-CoV-2 IgG S and IgG NCP antibodies, participants with prior symptomatic SARS-CoV-2 infection had significantly higher antibody levels than asymptomatic participants (Figure 1d). Moreover, we observed that the anti-NCP antibody levels in participants with mild to moderate COVID-19 symptoms could be divided into three subpopulations. However, as the course of the SARS-CoV-2 infection was based on the participants' personal assessments, there was a possibility that a more precise trend would have arisen if a more objective evaluation of COVID-19 symptom severity had been made.

3.5. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Level after Vaccination

Based on the WHO's recommendation and according to the Polish vaccination campaign strategy, HCWs were vaccinated during the phase 0 of the campaign. After two doses of the vaccine, 100% of the study participants developed anti-SARS-CoV-2 IgG S antibodies, ranging from 287 to 19,363 BAU/mL. We did not observe any effect of sex or age on the anti-SARS-CoV-2 S antibodies (Figure 2a,b). However, we found that the anti-SARS-CoV-2 IgG S antibody level after vaccination was significantly higher among participants previously infected with SARS-CoV-2 compared to infection-naïve participants (Figure 2c). In addition, the antibody response was correlated with COVID-19 severity, i.e., participants with mild to severe symptoms had significantly higher anti-SARS-CoV-2 IgG S antibody levels than asymptomatic participants, and the highest antibody levels were found among individuals who had severe COVID-19 (Figure 2d).

Due to the previously observed decrease in the prevalence of SARS-CoV-2 infection among the participants, we decided to analyze for vaccination antibodies approximately seven months after the second dose of the BNT162b2 vaccine. Simultaneously, we analyzed for changes in the anti-SARS-CoV-2 NCP antibody level by quantitative immunoblot. We observed an approximately 90–95% decrease in the anti-SARS-CoV-2 S antibodies developed after vaccination (Figure 3). Moreover, we did not find any effect of sex, age and previous SARS-CoV-2 infection on the antibody depletion rate (Supplementary Figure S2). In addition, we did not detect any vaccination antibodies among the four participants. Similarly, the anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies were completely depleted from the 19 previously COVID-19 positive participants, and among the rest of the previously SARS-CoV-2 infected participants, the antibody levels were approximately 85% lower compared to February 2021. Interestingly, for unknown reasons, we observed an increase in vaccination and post-infection antibodies among two and four individuals, respectively.

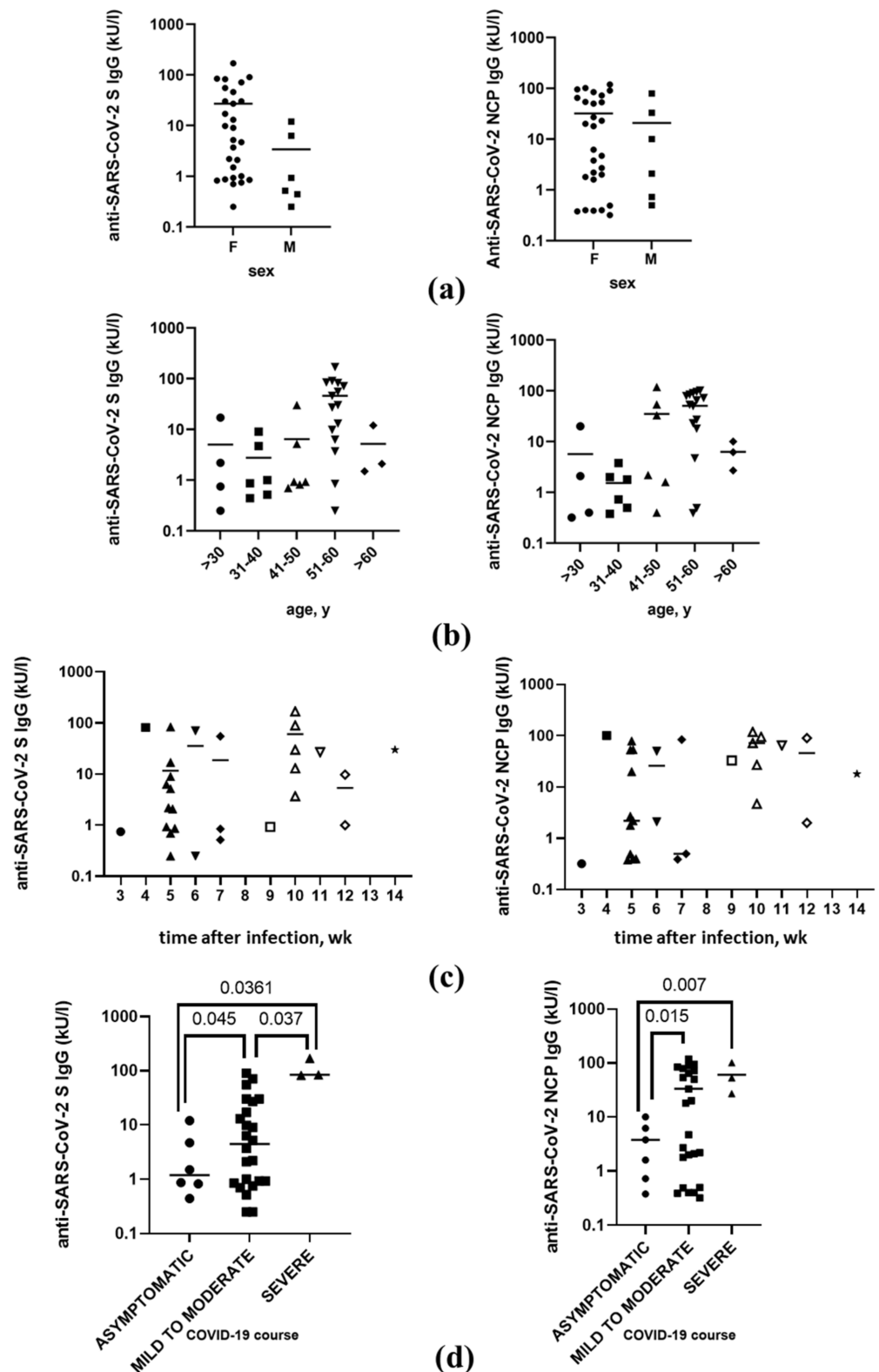


Figure 1. Levels of anti-SARS-CoV-2 spike protein (S, left panel) and anti-SARS-CoV-2 nucleoprotein (NCP, right panel) IgG antibodies among healthcare workers by (a) sex, (b) age, (c) time after SARS-CoV-2 infection, and (d) course of SARS-CoV-2 infection. F—female, M—male, y—years, wk—weeks, numbers above the brackets indicate *p*-value; each symbol represents a single study participant.

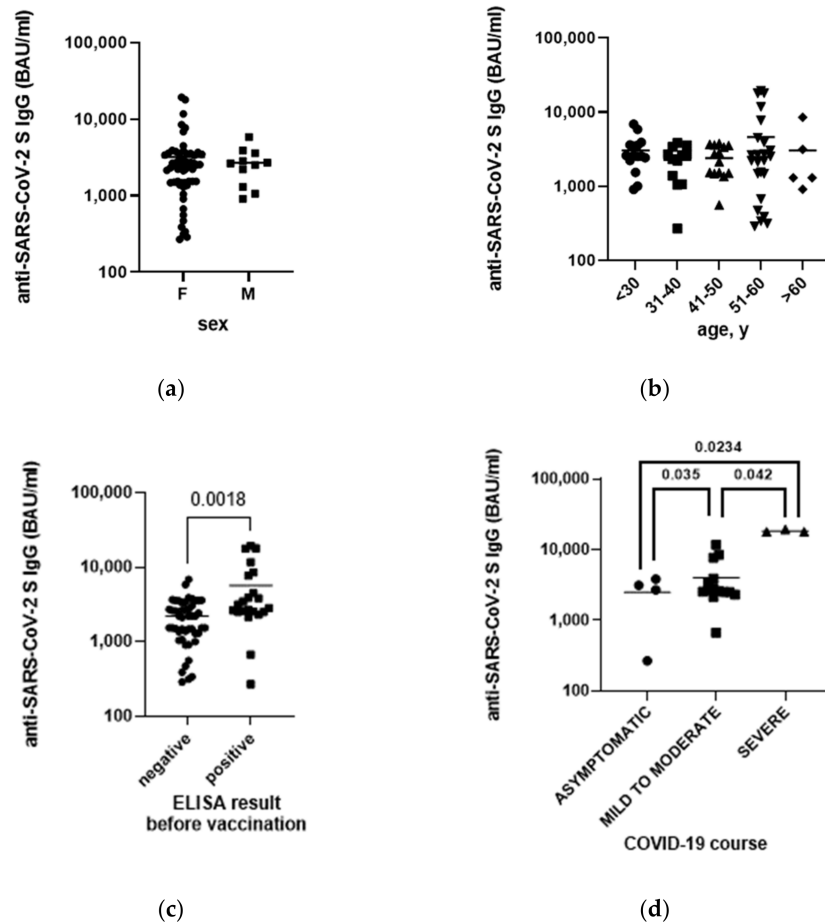


Figure 2. Levels of anti-SARS-CoV-2 spike protein (S) IgG antibodies approximately two weeks after the second dose of BNT162b2 mRNA vaccine by: (a) sex, (b) age, (c) ELISA result before vaccination; (d) course of SARS-CoV-2 infection. F—female; M—male; y—years; numbers above the brackets indicate *p*-value; each symbol represents a single study participant.

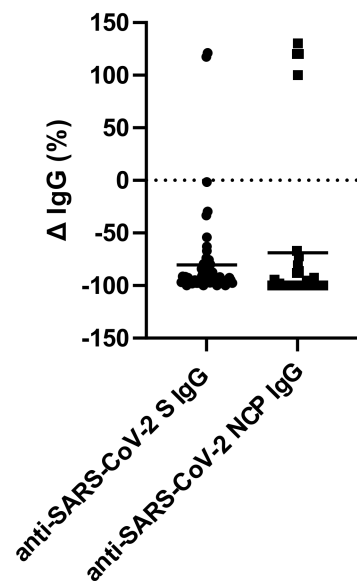


Figure 3. Changes in the anti-SARS-CoV-2 spike protein (S) and anti-SARS-CoV-2 nucleoprotein (NCP) IgG antibody levels six months after vaccination; each symbol represents a single study participant.

4. Discussion

Our previous study demonstrated that the highest SARS-CoV-2 infection risk in Poland was related to age, compliance with epidemiological recommendations, e.g., face mask, hand disinfection and social distancing, traveling abroad, and occupations related to constant contact with people, such as healthcare workers [4]. In light of this and to guarantee constant medical services, longitudinal analyses of COVID-19 cases among HCWs and estimations of SARS-CoV-2 infection in naïve HCWs should be performed on a regular basis. In the current study, we analyzed SARS-CoV-2 seroprevalence among HCWs at different times related to pandemic waves. However, we did not identify any HCWs with anti-SARS-CoV-2 antibodies after the first wave, i.e., May–September 2020. Very low seroprevalence among medical personnel at the same time was also noted in different Polish cities, i.e., Warsaw 0.85% [20], Opole 1.1% [21], and Lublin 2.4% [22], and low numbers of COVID-19 cases among HCWs after the first months of the pandemic were found in different countries, i.e., Germany 1.6% [24], Greece 1.3% [25], and the USA 1.1% [26,27]. This can be explained by low seroprevalence in the general population after the first wave of the pandemic, i.e., the Greater Poland region 0.97% [4], Greece 0.36% [28], and the USA 1% [29,30]. The low incidence of SARS-CoV-2 at the beginning of the pandemic implies that the population had little herd immunity heading into the second wave of the pandemic and may explain the dramatic increase in the number of COVID-19 cases, which also occurred among HCWs in later months. After the second wave of the pandemic, i.e., November 2020–January 2021, which led to 1.4 million confirmed COVID-19 cases and 33.4 thousand COVID-19-related deaths [15], we observed a significant increase in seroprevalence among enrolled HCWs. A similar observation was made among HCWs from different Polish cities, e.g., Lublin [22]; however, this seroprevalence was two times lower. These discrepancies can be explained by the differences in the number of confirmed COVID-19 cases at the end of the second wave of the pandemic in the Greater Poland and Lublin regions, 132,423 and 66,027, respectively [15]. Additionally, the prevalence of SARS-CoV-2 in the general population increased to between 11.2% and 22.9% [31], although this was to a lower extent compared to the analyzed HCWs, which confirmed our previous finding that HCWs have the highest risk for SARS-CoV-2 [4]. At later time points, i.e., after COVID-19 vaccinations, which were first administered to HCWs, we did not observe any new cases of SARS-CoV-2 infections among HCWs, while overall seropositivity in the Polish population grew dramatically. This decrease in the HCW's seroprevalence may be explained by antibody depletion and the effectiveness of the vaccine against infection, which was also demonstrated by others [32–34].

Differences in SARS-CoV-2 seroprevalence among HCWs have been demonstrated by many research groups. For example, a meta-analysis by Kayi et al. [35] indicated that the most common risk factors associated with higher seroprevalence rates were ethnicity, male gender, and a high number of household contacts, while working in a high-risk infection environment did not affect seropositivity. Galanis et al. [3] meta-analysis of COVID-19 risk factors defined as gender and household contacts additionally showed that working in a COVID-19 unit or as a front-line HCW was also associated with seropositivity. The clinical work environment, i.e., with high-risk exposure, was also highlighted as an important factor for seroprevalence in a cross-sectional study by Ebinger et al. [36] and Piccoli et al. [23]. In our study, we found that HCWs from low-risk infection environments had higher rates of seropositivity, which may be explained by the specificity of the work at the GaOW, including not enough time to perform COVID-19 diagnostics when pregnant women have started childbirth, the lower availability of and experience using personal protective equipment, and the uncontrolled behavior of women during labor contractions. Our observations confirmed findings demonstrated by Alishaq et al. [37] and Bampoe et al. [38], i.e., unusually high rates of SARS-CoV-2 infections among the maternity ward personnel, including breakthrough infections following vaccination. It should be highlighted that in the gynecology and obstetrics wards HCWs are used to working with non-infectious patients, and do not have proper knowledge, practice and experience to

handle patients with COVID-19 for example [39,40]. Therefore, some additional infectious diseases training, regular updates, as well as full availability of the personal protective equipment for the HCWs from the low infection risk HCUs are extremely important and should be included in the healthcare system maintenance. In addition, the higher seroprevalence at the GaOW can also be explained by the higher number of COVID-19 cases in Wrzesnia per 100,000 citizens compared to Poznan, that is, 1179.29 and 447.28, respectively (data from the end of the second pandemic wave in January 2021) [15]. These results are similar to those reported by Russel et al. [41], who observed that the local increase in COVID-19 cases may contribute to the higher seroprevalence among healthcare workers.

As a result of pathogen infection, the human body activates an immune response and, among others, starts producing pathogen-specific antibodies. The level of antibody response depends on the type of pathogen and its ability to inhibit and delay the human immune response, the age and gender of the infected patient, genetic predisposition, and overall health status, i.e., existing comorbidities [42], as well as lifestyle, diet, and physical activity levels [43]. However, with vaccination, humans can produce pathogen-specific antibodies that protect them from diseases they have not been previously infected with, which can sometimes lead to severe outcomes, patient health complications, and even death. The antibody response after vaccination depends on (i) vaccine factors, such as type, i.e., attenuated, inactivated, genetic, etc., dose, and adjuvant presence; (ii) administration factors, such as vaccination schedule, time of vaccination, and the number of doses and the periods between them; (iii) host factors, i.e., age, sex, genetics, and existing comorbidities; (iv) behavioral factors, i.e., smoking, alcohol consumption, exercise, and sleep and (v) nutritional factors, i.e., body mass index, micro- and macronutrients, and potential enteropathy [44]. In our study, we mostly focused on the host and environmental factors that affect post-infection and post-vaccination antibody responses. In both cases, we found very heterogeneous levels of antibodies and did not observe any association between the antibody level and the sex or age of the participants. Similar findings have been published by many scientists [45–48], while others have reported significant differences in anti-SARS-CoV-2 antibodies between the sexes and people of different ages. These very heterogeneous levels were also found in the relatively low number of COVID-19 convalescent study participants who donated their blood at different times after infection. Similar results were published by Moncunill et al. (2022) [49]. The number of participants and the overrepresentation of either men or women in the study groups may have contributed to these discrepancies.

According to the WHO, vaccination is the best and safest way to protect against infectious diseases. Vaccines last longer and are more effective in producing antibodies than those acquired following natural infections [50]. The current study confirmed this thesis: we found that the antibody level was approximately 1000 times higher after vaccination than after viral infection. A similar observation has been made by many other scientists [42,45,49,51–54]. Moreover, our data showed slightly higher levels of vaccination antibodies among women and the youngest participants, but there was no association between BNT162b2 vaccination antibodies and sex or age. A similar observation was also made by Moncunill et al., 2021 [49] and Tretyn et al., 2021, [45] while other groups have demonstrated an association between BNT162b2 vaccination antibodies two weeks post the second dose and the sex or age of the participants [54–57]. Higher antibody titers among women may be explained by stronger type I interferon responses upon stimulation with TLR7 ligands compared to men, which leads to a stronger vaccine response. Weaker vaccine responses in older individuals may be explained by comorbidities; weak immune systems, indicated by high neutrophil to lymphocyte ratios (NLR) and lower type I IFN [42]. It is worth noting that a high NLR is also a poor prognostic factor for COVID-19. Our study showed a significant association between post-infection and post-vaccination antibodies with a clinical course of COVID-19, i.e., a severe course is associated with the highest antibody titer after both infection and vaccination, while asymptomatic and mild infections

resulted in the lowest antibody titers. Our findings are in line with previously published studies [49,54,58–60].

Finally, the COVID-19 vaccination campaigns assumed two doses of the BNT162b2 vaccine two weeks apart, which should provide a high titer of antibodies protecting the HCWs from severe COVID-19 and hospitalization. Our study presented that approximately six months after the vaccination, the antibody level dramatically decreased. The antibody depletion six to eight months after vaccination was noted also by other authors [49,52,53]. In our study, we did not find any relevant factor associated with the antibody depletion rate, but others found that antibody depletion was faster among non-vaccinated participants than among vaccinated ones [52]. This may lead to the conclusion, that the antibody titers affect the depletion rate, i.e., individuals with asymptomatic and mild infection of SARS-CoV-2 lost their anti-COVID-19 immunity within a few weeks after the disease and are naïve to novel coronavirus reinfections. This highlights the overall importance of vaccination in the protection of our organisms from severe COVID-19. In addition, due to antibody depletion, the third and fourth vaccine dose, the so-called booster dose, should be taken to efficiently protect ourselves from severe SARS-CoV-2 infections. Moreover, the people from the severe COVID-19 risk groups, i.e., individuals over 60 years old, patients after transplantations, patients during anticancer treatment, and patients with immunodeficiencies, should consider a fourth COVID-19 vaccine dose, since their immune system is weaker and antibody titers are relatively lower than in healthy individuals and decreased within a few weeks [61].

To sum up, the biggest strengths of the presented study are (i) longitudinal analysis of the anti-SARS-CoV-2 antibodies among HCWs at four time points over one year, including the time periods after the second and third pandemic wave, as well as time points after COVID-19 vaccination; (ii) simultaneous analysis of the antibodies generated after natural infection (anti-NCP) and antibodies produced as a consequence of vaccination. Besides the above-mentioned strength, we are aware of some limitations of our study. Namely, we analyzed the antibody titers in a relatively small group ($N = 90$), overrepresented by women and in the case of GaOW overrepresented by individuals over 50 years old, which might bias the results. Moreover, the sample size estimation was extremely hard since no official data on the HCUs employees' number are provided, and only specific HCU number is known. In addition, it should be noted that the HCU size differs significantly depending on the region and patient number. Moreover, the Polish healthcare system allows HCWs to work in many HCUs in different cities, which complicates the estimation. It should be also highlighted that during the COVID-19 pandemic, the HCWs were very often working on their wards as well as COVID-19 units simultaneously. Therefore, in our opinion, the above-mentioned limitations only strengthen the necessity for further antibody titers analysis on the local and national levels.

5. Conclusions

The healthcare workers, who fight in the first line of the COVID-19 pandemic, are at the highest SARS-CoV-2 infection risk. Simultaneously, the healthcare system completely relies on the HCWs. Therefore, the HCW's herd immunity needs to be constantly analyzed and in case of immunity waning, some extra counter measurement needs to be taken. The best way to protect HCWs against infectious diseases is vaccination. Our study showed that the post-vaccination acquired immunity is stronger and last longer than the post-infection immune response. In addition, we demonstrated that the antibody response after natural infection depends on the clinical course of COVID-19, with the smallest antibody titer in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infections. Thus, it should be highlighted that only COVID-19 vaccination can stop the pandemic, SARS-CoV-2 spread around the globe, new cases and deaths associated with novel coronavirus, as well as the emergence of new genetic variants or virus strains potentially resistant to current vaccines. In addition, our data showed that the HCWs from low infection risk HCUs, such as gynecology and obstetrics wards are at higher infection risk since they lack proper training and expertise on how

to handle ‘infectious’ patients. This shows that to combat COVID-19, as well as future pandemics, each HCW needs to be properly prepared, trained and equipped.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines10101576/s1>. Figure S1. The schedule of the blood sampling from the healthcare workers. Blue line—number of daily new cases of COVID-19 in Poland; red droplets—blood sampling time points, syringes—vaccination time. Figure S2. Changes in the anti-SARS-CoV-2 spike protein antibody levels six months after vaccination by (a) sex, (b) age, (c) ELISA result before vaccination, (d) course of SARS-CoV-2 infection, and (e) healthcare unit. F—female, M—male, y—years, DIDaCN—Department of Infectious Diseases and Child Neurology, GaOW—Gynecology and Obstetrics Ward.

Author Contributions: Conceptualization, M.P.-K., M.F. and P.Z.; methodology, P.Z.; investigation, D.L. (Dagny Lorent), R.N. and D.L. (Dawid Luwański); writing—original draft preparation, D.L. (Dagny Lorent), R.N. and P.Z.; writing—review and editing, D.L. (Dagny Lorent) and P.Z.; supervision, P.Z.; funding acquisition, P.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Science Centre (Poland), grants numbers UMO-2020/01/0/NZ6/00152 and UMO/2018/31/F/NZ1/03891.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20, 17 June 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

Acknowledgments: The authors would like to thank Bogumiła Sroka and Renata Mokracka from the Gynecology and Obstetrics Ward, District Hospital in Wrzesnia for their help with blood collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Coronavirus. Available online: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus> (accessed on 25 July 2022).
2. Gómez-Ochoa, S.A.; Franco, O.H.; Rojas, L.Z.; Raguindin, P.F.; Roa-Díaz, Z.M.; Wyssmann, B.M.; Guevara, S.L.R.; Echeverría, L.E.; Glisic, M.; Muka, T. COVID-19 in Health-Care Workers: A Living Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence, Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcomes. *Am. J. Epidemiol.* **2021**, *190*, 161–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Galanis, P.; Vraka, I.; Fragkou, D.; Bilali, A.; Kaitelidou, D. Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies and Associated Factors in Healthcare Workers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *108*, 120–134. [[CrossRef](#)]
4. Lorent, D.; Nowak, R.; Roxo, C.; Lenartowicz, E.; Makarewicz, A.; Zaremba, B.; Nowak, S.; Kuszel, L.; Stefaniak, J.; Kierzek, R.; et al. Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Poznań, Poland, after the First Wave of the COVID-19 Pandemic. *Vaccines* **2021**, *9*, 541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Soleimanpour, S.; Yaghoubi, A. COVID-19 Vaccine: Where Are We Now and Where Should We Go? *Expert Rev. Vaccines* **2021**, *20*, 23–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kaur, S.P.; Gupta, V. COVID-19 Vaccine: A Comprehensive Status Report. *Virus Res.* **2020**, *288*, 198114. [[CrossRef](#)]
7. Lai, C.-C.; Chen, I.-T.; Chao, C.-M.; Lee, P.-I.; Ko, W.-C.; Hsueh, P.-R. COVID-19 Vaccines: Concerns beyond Protective Efficacy and Safety. *Expert Rev. Vaccines* **2021**, *20*, 1013–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cai, C.; Peng, Y.; Shen, E.; Huang, Q.; Chen, Y.; Liu, P.; Guo, C.; Feng, Z.; Gao, L.; Zhang, X.; et al. A Comprehensive Analysis of the Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2021**, *29*, 2794–2805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sharif, N.; Alzahrani, K.J.; Ahmed, S.N.; Dey, S.K. Efficacy, Immunogenicity and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 714170. [[CrossRef](#)]
10. Pormohammad, A.; Zarei, M.; Ghorbani, S.; Mohammadi, M.; Razizadeh, M.H.; Turner, D.L.; Turner, R.J. Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Vaccines* **2021**, *9*, 467. [[CrossRef](#)]
11. mRNA-1273 Vaccine (Moderna) against COVID-19 Background Document (Draft). Available online: [https://www.who.int/publications-detail-redirect/mrna-1273-vaccine-\(moderna\)-against-covid-19-background-document-\(draft\)](https://www.who.int/publications-detail-redirect/mrna-1273-vaccine-(moderna)-against-covid-19-background-document-(draft)) (accessed on 25 July 2022).

12. Background Document on mRNA Vaccine BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) against COVID-19. Available online: [https://www.who.int/publications-detail-redirect/background-document-on-mrna-vaccine-bnt162b2-\(pfizer-biontech\)-against-covid-19](https://www.who.int/publications-detail-redirect/background-document-on-mrna-vaccine-bnt162b2-(pfizer-biontech)-against-covid-19) (accessed on 25 July 2022).
13. The Role of Community Health Workers in COVID-19 Vaccination: Implementation Support Guide. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-NDVP-CHWs-role-2021.1> (accessed on 25 July 2022).
14. Narodowy Program Szczepień Przeciw COVID-19—Szczepienie Przeciwko COVID-19—Portal Gov.pl. Available online: <https://www.gov.pl/web/szczepimysie/narodowy-program-szczepien-przeciw-covid-19> (accessed on 22 August 2022).
15. Mapa Zarażeń—COVID-HUB. Available online: <https://covidhub.psnc.pl/mapa/> (accessed on 25 July 2022).
16. Zaszczepionych 93,24% Lekarzy. Available online: <http://www.mp.pl/social/article/277067> (accessed on 22 August 2022).
17. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [[CrossRef](#)]
18. Thomas, S.J.; Moreira, E.D.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Polack, F.P.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine through 6 Months. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1761–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Tartof, S.Y.; Slezak, J.M.; Fischer, H.; Hong, V.; Ackerson, B.K.; Ranasinghe, O.N.; Frankland, T.B.; Ogun, O.A.; Zamparo, J.M.; Gray, S.; 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*, 1407–1416. [[CrossRef](#)]
20. Kasztelewicz, B.; Janiszewska, K.; Burzyńska, J.; Szydłowska, E.; Migdał, M.; Dzierżanowska-Fangrat, K. Prevalence of IgG Antibodies against SARS-CoV-2 among Healthcare Workers in a Tertiary Pediatric Hospital in Poland. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bułdak, R.J.; Woźniak-Grygiel, E.; Wasik, M.; Kasperczyk, J.; Gawrylak-Dryja, E.; Mond-Paszek, R.; Konka, A.; Badura-Brzoza, K.; Fronczek, M.; Golec, M.; et al. SARS-CoV-2 Antibody Screening in Healthcare Workers in Non-Infectious Hospitals in Two Different Regions of Southern Poland (Upper Silesia and Opole Voivodeships): A Prospective Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Korona-Główniak, I.; Mielnik, M.; Podgajna, M.; Grywalska, E.; Hus, M.; Matuska, K.; Wojtysiak-Duma, B.; Duma, D.; Glowniak, A.; Malm, A. SARS-CoV-2 Seroprevalence in Healthcare Workers before the Vaccination in Poland: Evolution from the First to the Second Pandemic Outbreak. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 2319. [[CrossRef](#)]
23. Piccoli, L.; Ferrari, P.; Piumatti, G.; Jovic, S.; Rodriguez, B.F.; Mele, F.; Giacchetto-Sasselli, I.; Terrot, T.; Silacci-Fregni, C.; Cameroni, E.; et al. Risk Assessment and Seroprevalence of SARS-CoV-2 Infection in Healthcare Workers of COVID-19 and Non-COVID-19 Hospitals in Southern Switzerland. *Lancet Reg. Health—Eur.* **2021**, *1*, 100013. [[CrossRef](#)]
24. Korth, J.; Wilde, B.; Dolff, S.; Anastasiou, O.E.; Krawczyk, A.; Jahn, M.; Cordes, S.; Ross, B.; Esser, S.; Lindemann, M.; et al. SARS-CoV-2-Specific Antibody Detection in Healthcare Workers in Germany with Direct Contact to COVID-19 Patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **2020**, *128*, 104437. [[CrossRef](#)]
25. Psychogiou, M.; Karabinis, A.; Pavlopoulou, I.D.; Basoulis, D.; Petsios, K.; Roussos, S.; Pratikaki, M.; Jahaj, E.; Protopapas, K.; Leontis, K.; et al. Antibodies against SARS-CoV-2 among Health Care Workers in a Country with Low Burden of COVID-19. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0243025. [[CrossRef](#)]
26. Brant-Zawadzki, M.; Fridman, D.; Robinson, P.A.; Zahn, M.; Chau, C.; German, R.; Breit, M.; Bock, J.R.; Hara, J. SARS-CoV-2 Antibody Prevalence in Health Care Workers: Preliminary Report of a Single Center Study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0240006. [[CrossRef](#)]
27. Brant-Zawadzki, M.; Fridman, D.; Robinson, P.A.; Zahn, M.; Chau, C.; German, R.; Breit, M.; Burke, E.; Bock, J.R.; Hara, J. Prevalence and Longevity of SARS-CoV-2 Antibodies Among Health Care Workers. *Open Forum Infect. Dis.* **2021**, *8*, ofab015. [[CrossRef](#)]
28. Bogogiannidou, Z.; Vontas, A.; Dadouli, K.; Kyritsi, M.A.; Soteriades, S.; Nikoulis, D.J.; Mouchtouri, V.A.; Koureas, M.; Kazakos, E.I.; Spanos, E.G.; et al. Repeated Leftover Serosurvey of SARS-CoV-2 IgG Antibodies, Greece, March and April 2020. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2001369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Menachemi, N. Population Point Prevalence of SARS-CoV-2 Infection Based on a Statewide Random Sample—Indiana, April 25–29, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2020**, *69*, 960–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sutton, M.; Cieslak, P.; Linder, M. Notes from the Field: Seroprevalence Estimates of SARS-CoV-2 Infection in Convenience Sample—Oregon, May 11–June 15, 2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2020**, *69*, 1100–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zejda, J.E.; Brożek, G.M.; Kowalska, M.; Barański, K.; Kaleta-Pilarska, A.; Nowakowski, A.; Xia, Y.; Buszman, P. Seroprevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in a Random Sample of Inhabitants of the Katowice Region, Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 3188. [[CrossRef](#)]
32. Benenson, S.; Oster, Y.; Cohen, M.J.; Nir-Paz, R. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine Effectiveness among Health Care Workers. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1775–1777. [[CrossRef](#)]
33. Bianchi, F.P.; Tafuri, S.; Migliore, G.; Vimercati, L.; Martinelli, A.; Lobifaro, A.; Diella, G.; Stefanizzi, P.; on behalf of the Control Room Working Group. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine Effectiveness in the Prevention of SARS-CoV-2 Infection and Symptomatic Disease in Five-Month Follow-Up: A Retrospective Cohort Study. *Vaccines* **2021**, *9*, 1143. [[CrossRef](#)]

34. Bedston, S.; Akbari, A.; Jarvis, C.I.; Lowthian, E.; Torabi, F.; North, L.; Lyons, J.; Perry, M.; Griffiths, L.J.; Owen, R.K.; et al. COVID-19 Vaccine Uptake, Effectiveness, and Waning in 82,959 Health Care Workers: A National Prospective Cohort Study in Wales. *Vaccine* **2022**, *40*, 1180–1189. [[CrossRef](#)]
35. Kayı, İ.; Madran, B.; Keske, Ş.; Karanfil, Ö.; Arribas, J.R.; Pshenichnaya, N.; Petrosillo, N.; Gönen, M.; Ergönül, Ö. The Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies among Health Care Workers before the Era of Vaccination: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1242–1249. [[CrossRef](#)]
36. Ebinger, J.E.; Joung, S.; Liu, Y.; Wu, M.; Weber, B.; Claggett, B.; Botting, P.G.; Sun, N.; Driver, M.; Kao, Y.H.; et al. Demographic and Clinical Characteristics Associated with Variations in Antibody Response to BNT162b2 COVID-19 Vaccination among Healthcare Workers at an Academic Medical Centre: A Longitudinal Cohort Analysis. *BMJ Open* **2022**, *12*, e059994. [[CrossRef](#)]
37. Alishaq, M.; Nafady-Hego, H.; Jeremijenko, A.; Ajmi, J.A.A.; Elgendy, M.; Vinoy, S.; Fareh, S.B.; Plaatjies, J.V.; Nooh, M.; Alanzi, N.; et al. Risk Factors for Breakthrough SARS-CoV-2 Infection in Vaccinated Healthcare Workers. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0258820. [[CrossRef](#)]
38. Bampoe, S.; Lucas, D.N.; Neall, G.; Scales, P.; Aggarwal, R.; Caulfield, K.; Siassakos, D.; Odor, P.M. A Cross-Sectional Study of Immune Seroconversion to SARS-CoV-2 in Frontline Maternity Health Professionals. *Anaesthesia* **2020**, *75*, 1614–1619. [[CrossRef](#)]
39. Coxon, K.; Turienzo, C.F.; Kweekel, L.; Goodarzi, B.; Brigante, L.; Simon, A.; Lanau, M.M. The Impact of the Coronavirus (COVID-19) Pandemic on Maternity Care in Europe. *Midwifery* **2020**, *88*, 102779. [[CrossRef](#)]
40. Schmitt, N.; Mattern, E.; Cignacco, E.; Seliger, G.; König-Bachmann, M.; Striebich, S.; Ayerle, G.M. Effects of the COVID-19 Pandemic on Maternity Staff in 2020—A Scoping Review. *BMC Health Serv. Res.* **2021**, *21*, 1364. [[CrossRef](#)]
41. Russell, A.; Hsu, E.B.; Fenstermacher, K.Z.J.; Ricketts, E.P.; Dashler, G.; Chen, A.; Shaw-Saliba, K.; Caturegli, P.P.; Pekosz, A.; Rothman, R.E. Characteristics of SARS-CoV-2 Seropositivity among Emergency Department Healthcare Workers at a Tertiary Care Center in Baltimore. *Healthcare* **2022**, *10*, 576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brodin, P. Immune Determinants of COVID-19 Disease Presentation and Severity. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 28–33. [[CrossRef](#)]
43. Talaei, M.; Faustini, S.; Holt, H.; Jolliffe, D.A.; Vivaldi, G.; Greenig, M.; Perdek, N.; Maltby, S.; Bigogno, C.M.; Symons, J.; et al. Determinants of Pre-Vaccination Antibody Responses to SARS-CoV-2: A Population-Based Longitudinal Study (COVIDENCE UK). *BMC Med.* **2022**, *20*, 87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zimmermann, P.; Curtis, N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00084-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tretyn, A.; Szczepanek, J.; Skorupa, M.; Jarkiewicz-Tretyn, J.; Sandomierz, D.; Dejewski, J.; Ciechanowska, K.; Jarkiewicz-Tretyn, A.; Koper, W.; Pałgan, K. Differences in the Concentration of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies Post-COVID-19 Recovery or Post-Vaccination. *Cells* **2021**, *10*, 1952. [[CrossRef](#)]
46. Rydzynski Moderbacher, C.; Ramirez, S.I.; Dan, J.M.; Grifoni, A.; Hastie, K.M.; Weiskopf, D.; Belanger, S.; Abbott, R.K.; Kim, C.; Choi, J.; et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* **2020**, *183*, 996–1012. [[CrossRef](#)]
47. Krammer, F.; Srivastava, K.; Alshammari, H.; Amoako, A.A.; Awawda, M.H.; Beach, K.F.; Bermúdez-González, M.C.; Bielak, D.A.; Carreño, J.M.; Chernet, R.L.; et al. Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1372–1374. [[CrossRef](#)]
48. Takahashi, T.; Ellingson, M.K.; Wong, P.; Israelow, B.; Lucas, C.; Klein, J.; Silva, J.; Mao, T.; Oh, J.E.; Tokuyama, M.; et al. Sex Differences in Immune Responses That Underlie COVID-19 Disease Outcomes. *Nature* **2020**, *588*, 315–320. [[CrossRef](#)]
49. Moncunill, G.; Aguilar, R.; Ribes, M.; Ortega, N.; Rubio, R.; Salmerón, G.; Molina, M.J.; Vidal, M.; Barrios, D.; Mitchell, R.A.; et al. Determinants of Early Antibody Responses to COVID-19 mRNA Vaccines in a Cohort of Exposed and Naïve Healthcare Workers. *EBioMedicine* **2022**, *75*, 103805. [[CrossRef](#)]
50. Röltgen, K.; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025–1040. [[CrossRef](#)]
51. Anichini, G.; Terrosi, C.; Gandolfo, C.; Gori Savellini, G.; Fabrizi, S.; Miceli, G.B.; Cusi, M.G. SARS-CoV-2 Antibody Response in Persons with Past Natural Infection. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 90–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ali, H.; Alahmad, B.; Al-Shammari, A.A.; Alterki, A.; Hammad, M.; Cherian, P.; Alkhairi, I.; Sindhu, S.; Thanaraj, T.A.; Mohammad, A.; et al. Previous COVID-19 Infection and Antibody Levels After Vaccination. *Front. Public Health* **2021**, *9*, 1964. [[CrossRef](#)]
53. Yang, Y.; Yang, M.; Peng, Y.; Liang, Y.; Wei, J.; Xing, L.; Guo, L.; Li, X.; Li, J.; Wang, J.; et al. Longitudinal Analysis of Antibody Dynamics in COVID-19 Convalescents Reveals Neutralizing Responses up to 16 Months after Infection. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 423–433. [[CrossRef](#)]
54. Wolszczak-Biedrzycka, B.; Bieńkowska, A.; Dorf, J. Assessment of Post-Vaccination Antibody Response Eight Months after the Administration of BNT162b2 Vaccine to Healthcare Workers with Particular Emphasis on the Impact of Previous COVID-19 Infection. *Vaccines* **2021**, *9*, 1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Anastassopoulou, C.; Antoni, D.; Manoussopoulos, Y.; Stefanou, P.; Argyropoulou, S.; Vrioni, G.; Tsakris, A. Age and Sex Associations of SARS-CoV-2 Antibody Responses Post BNT162b2 Vaccination in Healthcare Workers: A Mixed Effects Model across Two Vaccination Periods. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0266958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Ward, H.; Whitaker, M.; Flower, B.; Tang, S.N.; Atchison, C.; Darzi, A.; Donnelly, C.A.; Cann, A.; Diggle, P.J.; Ashby, D.; et al. Population Antibody Responses Following COVID-19 Vaccination in 212,102 Individuals. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Pellini, R.; Venuti, A.; Pimpinelli, F.; Abril, E.; Blandino, G.; Campo, F.; Conti, L.; De Virgilio, A.; De Marco, F.; Di Domenico, E.G.; et al. Initial Observations on Age, Gender, BMI and Hypertension in Antibody Responses to SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccine. *EClinicalMedicine* **2021**, *36*, 100928. [[CrossRef](#)]
58. Chen, X.; Pan, Z.; Yue, S.; Yu, F.; Zhang, J.; Yang, Y.; Li, R.; Liu, B.; Yang, X.; Gao, L.; et al. Disease Severity Dictates SARS-CoV-2-Specific Neutralizing Antibody Responses in COVID-19. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Long, Q.-X.; Tang, X.-J.; Shi, Q.-L.; Li, Q.; Deng, H.-J.; Yuan, J.; Hu, J.-L.; Xu, W.; Zhang, Y.; Lv, F.-J.; et al. Clinical and Immunological Assessment of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1200–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Röltgen, K.; Powell, A.E.; Wirz, O.F.; Stevens, B.A.; Hogan, C.A.; Najeeb, J.; Hunter, M.; Wang, H.; Sahoo, M.K.; Huang, C.; et al. Defining the Features and Duration of Antibody Responses to SARS-CoV-2 Infection Associated with Disease Severity and Outcome. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*, eabe0240. [[CrossRef](#)]
61. Nordström, P.; Ballin, M.; Nordström, A. Effectiveness of a Fourth Dose of mRNA COVID-19 Vaccine against All-Cause Mortality in Long-Term Care Facility Residents and in the Oldest Old: A Nationwide, Retrospective Cohort Study in Sweden. *Lancet Reg. Health—Eur.* **2022**, *21*, 100466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Figure S1

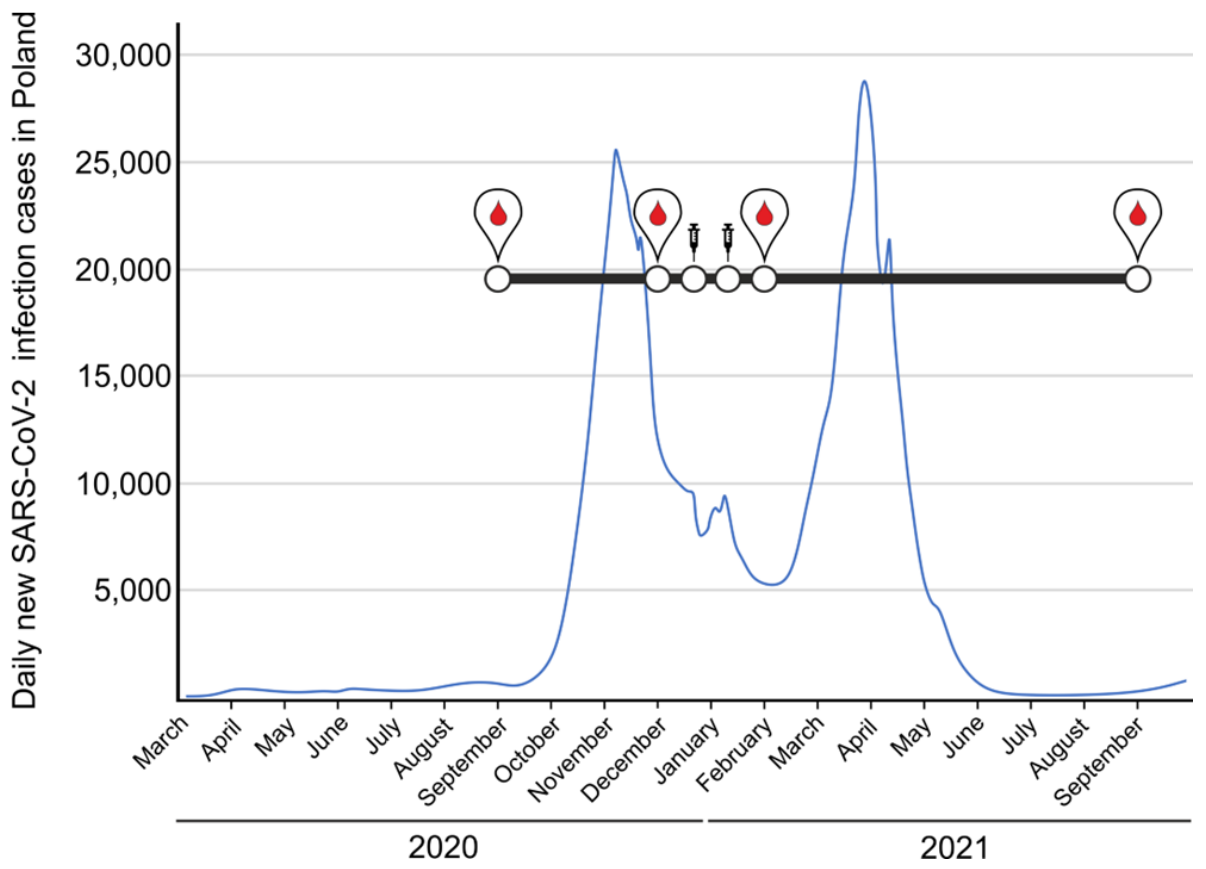
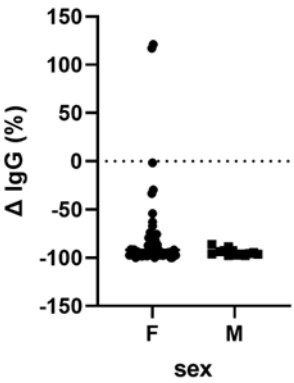
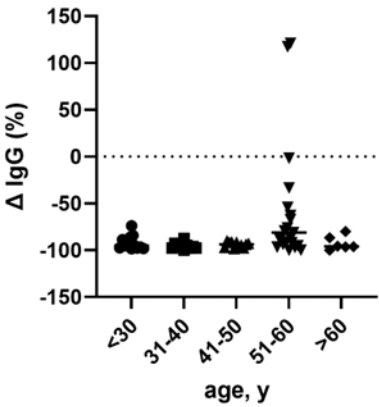


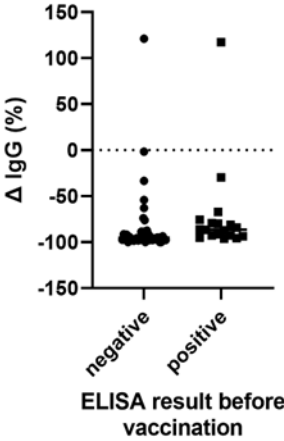
Figure S2



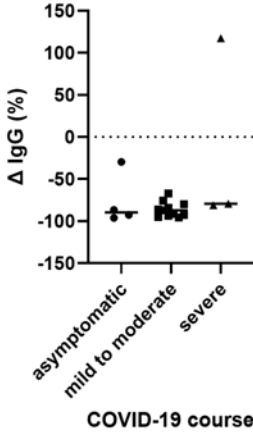
(a)



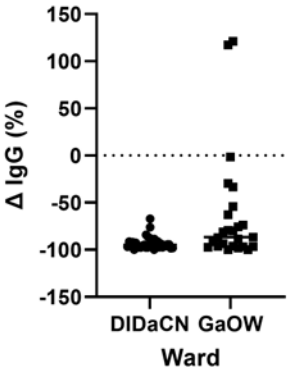
(b)



(c)



(d)



(e)

Article

Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 Homologous Vaccination Antibody Response among Teachers in Poznan, Poland

Dagny Lorent ¹, Rafał Nowak ¹, Monika Jankowska ¹, Łukasz Kuszel ² and Paweł Zmora ^{1,*}¹ Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland² Department of Medical Genetics, Poznan University of Medical Sciences, 60-806 Poznan, Poland

* Correspondence: pzmora@ibch.poznan.pl; Tel.: +48-61-852-85-03

Abstract: Children are among the best vectors to spread respiratory viruses, including emerging variants of SARS-CoV-2 due to the asymptomatic or relatively mild course of infection and simultaneously high titres of pathogens in the respiratory tract. Therefore, individuals who have constant contact with children, e.g., teachers should be vaccinated against COVID-19 as essential workers within the first phases of a vaccination campaign. In Poland, primary and secondary school teachers were vaccinated with ChAdOx1 from February 2021 with a three month interval between the two doses, while lecturers at medical universities, who are simultaneously healthcare workers, received the BNT126b2 vaccine from December 2020 with three weeks between the first and second doses. The aim of this study was to compare the antibody responses at two weeks and three months after vaccination and to estimate the vaccine effectiveness against COVID-19 among infection-naïve teachers vaccinated with mRNA and a vector vaccine. We found that the anti-SARS-CoV-2 spike protein antibodies were significantly higher among the lecturers but antibody waning was slower among the schoolteachers. However, those vaccinated with ChAdOx1 complained significantly more often of vaccine side effects. In addition, during the three months after the second vaccine dose no study participants were infected with SARS-CoV-2. The BNT126b2 vaccine gave higher antibody titres in comparison with ChAdOx1 but protection against COVID-19 in both cases was similar. Moreover, we did not find any anti-SARS-CoV-2 nucleoprotein antibodies at two weeks as well as at three months after vaccination among the study participants, which shows a very high vaccine effectiveness in the occupational group with a high SARS-CoV-2-infection risk.

Keywords: SARS-CoV-2; antibodies; teachers; seroprevalence; vaccine; Poland

Citation: Lorent, D.; Nowak, R.; Jankowska, M.; Kuszel, L.; Zmora, P. Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 Homologous Vaccination Antibody Response among Teachers in Poznan, Poland. *Vaccines* **2023**, *11*, 118. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010118>

Academic Editors: Fabriziomaria Gobba, Alberto Modenese, Lode Godderis and Caterina Ledda

Received: 22 November 2022

Revised: 28 December 2022

Accepted: 31 December 2022

Published: 3 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

There is an urgent need to address the health problems associated with the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Since its outbreak in December 2019 in Wuhan, China, the WHO has reported over 630 million confirmed COVID-19 cases and 6.58 million COVID-19 related deaths worldwide with almost 6.3 million cases and approximately 118 thousand deaths in Poland (as of November 2022) [1]. Global efforts to prevent SARS-CoV-2 transmission have led to the development of effective vaccines based on different platforms: mRNA in liposomes, viral vectors, and inactivated viruses [2–4]. As of 22 November 2022, there have been 172 vaccine candidates in clinical development [5] and the European Medicines Agency has authorised six vaccines for use, i.e., BNT162b2 (Pfizer, New York, NY, USA/BioNTech, Mainz, Germany), mRNA-1273 (Moderna, Cambridge, MA, USA), ChAdOx1 (Astra Zeneca, Cambridge, UK/Oxford University, Oxford, UK), Ad26.COV2.S (Janssen Pharmaceutical Companies, Beerse, Belgium), NVX-CoV2373 (Novavax, Gaithersburg, MD, USA), and VLA2001 (Valneva, Vienna, Austria) [6].

However, at the beginning of the vaccination roll-out in December 2020 the types of vaccines and number of doses available were limited. Therefore, many countries scheduled priority groups based on SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity risks [7,8].

The Polish national vaccination strategy was divided into four phases. Initially, vaccines were administered to healthcare workers (HCWs), social care workers, and medical students (phase 0); then vaccines were offered to individuals over 60 years of age, residents in long-term care facilities, and public service workers (phase I); next to adults with comorbidities and other essential workers (phase II); and finally to persons over 16 years of age (phase III) [9]. During the vaccination campaign in Poland, five vaccine products were deployed: BNT162b2 since 23 December 2020; ChAdOx1 and mRNA-1273 since 6 January 2021; Ad26.COVS since 3 February 2021; and NVX-CoV2373 since 2 March 2022. Different COVID-19 vaccine products were recommended for specific priority groups and adjusted according to the current epidemiological situation [9]. The BNT162b2 vaccines were administered to HCWs since 27 December 2020, whereas teachers were receiving ChAdOx1 vaccines since 12 February 2021 [9]. Both BNT162b2 and ChAdOx1 elicit immune responses mainly against the receptor-binding domain (RBD) of the spike (S) protein. However, the S protein consists, additionally of the following domains: N-terminal domain (NTD), fusion peptide (FP), two heptad repeats (HR1 and HR2), a transmembrane domain (TM), and a cytoplasmic tail (CT), which may be also a target for antibodies produced as a result of vaccination. The structure of the SARS-CoV-2 S protein is well presented by Huang et al. [10]. It should also be highlighted that different vaccine types utilize different nucleotide sequences as well as delivery methods. ChAdOx1 encodes a full-length S protein identical to the SARS-CoV-2 wild-type (wt) strain, i.e., Wuhan-Hu-1 [11]. In contrast, the BNT162b2 contains nucleoside modified mRNA with pseudouridines and differs in two amino acids from the wt S protein sequence; the different amino acids stabilize the construct in the cellular environment and stabilize the prefusion conformation of the S protein [12]. The ChAdOx1 is delivered in the replication-deficient chimpanzee adenovirus-vector, whereas BNT162b2 contains the nucleoside modified mRNA sequence encapsulated in lipid nanoparticles [11,12]. Both vaccines are administered intramuscularly and were shown to be effective in the delivery of viral antigens, thereby stimulating the host immune system to recognize SARS-CoV-2. Nevertheless, the response of the immune system to COVID-19 vaccination as well as the duration of protection is not fully understood. Therefore, the aim of this study was to determine the anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels in infection-naïve education workers in primary schools and in medical universities after homologous ChAdOx1 or BNT162b2 vaccination, and to estimate the vaccines effectiveness against COVID-19 in those occupational groups.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants and Design

We invited approximately 100 teachers from several primary schools in Poznan, as well as 100 academic teachers from Poznan University of Medical Sciences (PUMS) to participate in our study and obtained a positive response from 36 and 45 individuals, respectively. The primary school teachers were vaccinated twice with ChAdOx1 vaccine with a three month interval between the two doses. The PUMS academic teachers, who simultaneously were HCWs (physicians and laboratory diagnosticians), were vaccinated with the two doses of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine with a three week interval between the first and second dose.

Written questionnaires were used to collect data on sex, age, comorbidities, COVID-19 history, and the administered vaccine type from all the participants. Additionally, the study participants were asked about the side effects following the vaccination.

Blood specimens were collected from all the enrolled study participants at the IBCH PAS, Poznan, Poland, two weeks and approximately three months after the completion of the homologous vaccination schedule. Unfortunately, 19 out of the 35 primary school

teachers and 16 out of the 45 PUMS academic teachers did not attend, did not answer our contact attempts, and thus did not donate their blood at the second time point.

2.2. Laboratory Analysis

The anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels after vaccination were measured using quantitative SARS-CoV-2 IgG QuantiSpike ELISA assay (TK040, Vitrotest Europe, Wroclaw, Poland) targeting spike (S) protein. To test whether the study participants were infected with SARS-CoV-2 we used rapid cassette tests: 2019-novel coronavirus IgG/IgM antibody detection kit (Vazyme), which detects anti-SARS-CoV-2 N antibodies generated only after natural infection. Tests were performed and interpreted according to the manufacturer's instructions.

2.3. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software. The differences between the two groups were analysed by the Mann–Whitney test. The data were accepted as statistically different if $p < 0.05$.

2.4. Ethics Approval

The study was approved by the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20 from June 2019). In addition, written informed consent was obtained from each of the study participant before blood collection.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Participants

The study group consisted of 81 teachers: 36 from schools and 45 from PUMS (Table 1). Most of the participants were female: 91.67% ($n = 33$) from schools and 86.67% ($n = 39$) from PUMS. From the schools, the mean age of the enrolled individuals was 45.3 ± 11.7 years and over half (52.78%, $n = 19$) did not report any comorbidities, whereas 33.3% ($n = 12$) suffered from circulatory system chronic diseases (CDs), 11.11% ($n = 4$) from autoimmunological CDs, 5.56% ($n = 2$) respiratory system CDs, and 2.78% ($n = 1$) had a mental disorder. The PUMS lecturers were aged 37.9 ± 13.2 years on average and most (80%; $n = 36$) were healthy; however, some individuals had circulatory (8.89%, $n = 4$), respiratory (8.89%, $n = 4$), autoimmunological (2.22%, $n = 1$) CDs, and 2.22% ($n = 1$) had a mental disorder (Table 1). Notably, none of the participants reported a history of COVID-19 and did not produce anti-SARS-CoV-2 N antibodies as a result of natural infection (Table 1).

Table 1. Characteristics of the study participants.

	Study Participants	
	Primary School Teachers	Academic Teachers
Number of participants	36 (100%)	45 (100%)
Sex		
Female	33 (91.67%)	39 (86.67%)
Male	3 (8.33%)	6 (13.33%)
Age		
<30 y.o.	6 (16.67%)	15 (33.33%)
31–40 y.o.	3 (8.83%)	12 (26.67%)
41–50 y.o.	12 (33.33%)	12 (26.67%)
51–60 y.o.	13 (36.10%) ^a	2 (4.44%) ^b
>60 y.o.	2 (5.56%)	4 (8.89%)
Comorbidities and CDs		
None	19 (52.78%) ^a	36 (80.00%) ^b
Circulatory system CDs, i.e., hypertension	12 (33.33%)	4 (8.89%)

Table 1. Cont.

	Study Participants	
	Primary School Teachers	Academic Teachers
Respiratory system CDs, i.e., asthma	2 (5.56%)	1 (2.22%)
Infectious CDs, i.e., HIV/AIDS	-	-
Chronic kidney diseases	-	-
Digestive track CDs, i.e., Crohn diseases	-	-
Autoimmunological CDs, i.e., allergies	4 (11.11%)	4 (8.89%)
Neoplastic diseases, i.e., cancer	-	-
Metabolic diseases, i.e., diabetes	-	-
Mental disorders, i.e., depression	1 (2.78%)	1 (2.22%)
COVID-19		
COVID-19 history	-	-
anti-SARS-CoV-2 N antibodies presence	0	0
COVID-19 vaccinated individuals	36 (100%)	45 (100%)
Type of vaccines	vector—ChAdOx1 (Astra Zeneca)	mRNA—BNT162b2 (Pfizer/BioNTech)

CDs—chronic diseases; a, b—values with different superscripts within the row are significantly different.

3.2. Anti-SARS-CoV-2 IgG S Antibody Levels at Two Weeks after the Second Dose of the COVID-19 Vaccine

Regardless of the vaccine type, all the study participants developed anti-SARS-CoV-2 S IgG antibodies two weeks after the second vaccine dose. The antibody levels in the BNT162b2 vaccinated individuals ranged from 388 to 3910 BAU/mL, and in the ChAdOx1 recipients from 33 to 1897 BAU/mL (Figure 1). The average anti-SARS-CoV-2 S IgG antibody levels were significantly higher among the BNT162b2 vaccinated individuals (1492 ± 700 BAU/mL) in comparison with the ChAdOx1 recipient group (426.9 ± 461 BAU/mL) (Figure 1).

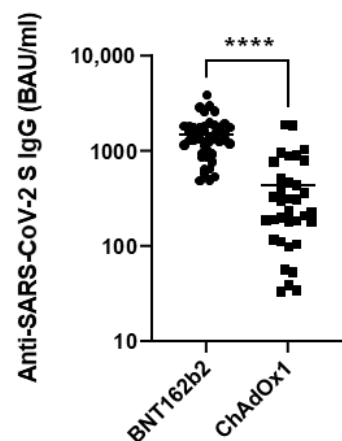


Figure 1. Levels of anti-SARS-CoV-2 spike protein (S) IgG antibodies two weeks after the two homologous doses of BNT162b2 or ChAdOx1 vaccines. ****— $p < 0.001$.

3.3. Side Effects after Two Doses of Either BNT162b2 or ChAdOx1

After the two BNT162b2 vaccine doses, 6.67% ($n = 3$) of recipients reported at least one side effect. The most commonly reported side effects were fever (6.67%, $n = 3$), followed by chills (2.22%, $n = 1$), fatigue (2.22%, $n = 1$), and headache (2.22%, $n = 1$). In contrast, in the ChAdOx1 group 72.22% ($n = 26$) of the recipients reported at least one side effect after two vaccine doses. More than half had fever (52.78%, $n = 19$), followed by muscle and joint pain (41.67%, $n = 15$), headache (36.11%, $n = 13$), fatigue (19.44%, $n = 7$), chills (16.67%, $n = 6$), pain at the injection site (11.11%, $n = 4$), diarrhoea (2.78%, $n = 1$), and vomiting (2.78%, $n = 1$). Thus, for both vaccine types, fever was the most frequent side effect. However, when compared with the BNT162b2 group, side effects were more frequent and varied in the ChAdOx1 group (Figure 2).

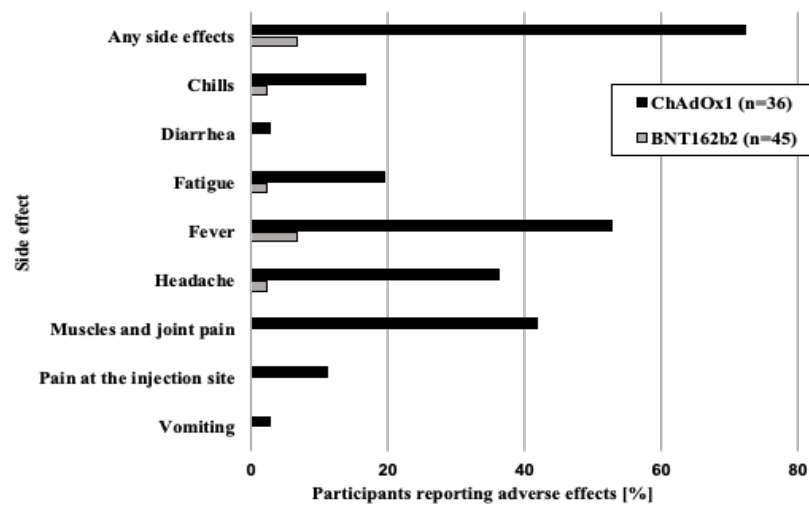


Figure 2. Side effects after the two doses of BNT62b2 or ChAdOx1 vaccine. Participants could report more than one side effect.

3.4. Anti-SARS-CoV-2 IgG S Antibody Levels Three Months after Vaccination

In the follow-up study, 29 of the 45 participants vaccinated with BNT162b2 and 16 of the 35 vaccinated with ChAdOx1 provided blood samples. Three months after the second vaccine dose administration, eight study participants vaccinated with BNT162b2 and one individual from the ChAdOx1 vaccinated group did not have any detectable anti-SARS-CoV-2 S IgG antibodies. In addition, we observed that the participants who remained seropositive exhibited a significant decline in antibody titres (Figure 3a). Within 10–12 weeks after the second vaccine dose, the antibody levels in the BNT162b2 recipients decreased by $90.8 \pm 11.6\%$ and by $67.28 \pm 21.98\%$ in the ChAdOx1 recipients (Figure 3b). Three months after vaccination, none of the analysed study participants developed anti-SARS-CoV-2 N antibodies, which shows the very high effectiveness in protection against COVID-19 of both vaccines.

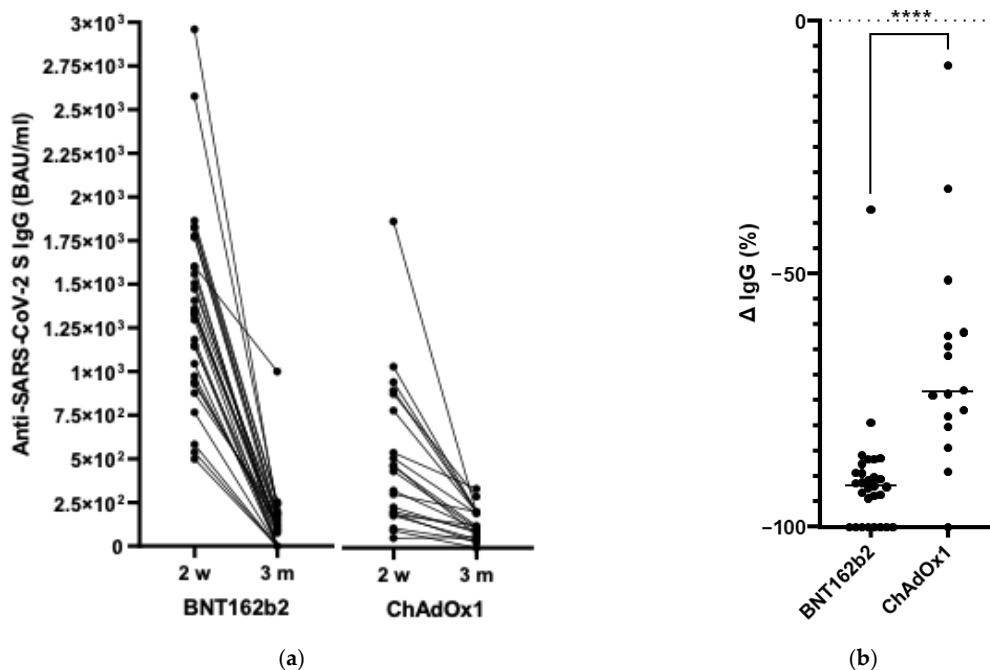


Figure 3. The anti-SARS-CoV-2 spike protein IgG antibody waning among teachers vaccinated with BNT162b2 or ChAdOx1 (a) from two weeks to three months after the second vaccination second dose, and (b) presented as a percentage change at three months post vaccination. ****— $p < 0.001$.

4. Discussion

To our knowledge this is the first study of the anti-SARS-CoV-2 IgG S antibody response following COVID-19 vaccination among education workers in Poland. Lecturers and primary and secondary school teachers were in the second vaccination priority group in Poland, except those academics who were simultaneously HCWs employed at a medical university who were vaccinated during the so-called phase 0 [9]. According to the UNESCO/UNICEF/World Bank/OECD Survey on National Education Responses to COVID-19 School Closure, 72% of countries (146 of 204) prioritised teachers for vaccination; however, the vaccination rate differs widely among countries with the highest proportions of vaccinated teachers being in high-income countries, e.g., Portugal, Chile, Sweden, and Saudi Arabia, while relatively low teacher vaccination rates were found in low-income countries, e.g., Algeria and Venezuela [4]. According to the Polish Ministry of Education and Science more than 90% of primary and secondary school teachers and 89% of lecturers were administered with the first dose of the vaccine against COVID-19 in February 2022, while the general vaccination rate in Poznan at the beginning of our study was estimated as 3.84% [9,13]. Education workers are among the most vaccinated occupational groups in Poland and the percentage of individuals fully protected against severe COVID-19 is much higher than that of the general Polish population (57.8%) [13]. Unfortunately, there are no detailed data available on primary and secondary school teacher vaccinations (e.g., differences in the number of vaccinated education workers between primary and secondary schools) or comparisons of vaccination rates in specific regions. However, taking into consideration that Poznan, and the Greater Poland region, has one of the highest levels of vaccinated citizens [13], we may assume that vaccination rates among teachers are also among the highest. The rates among the PUMS academics and the PhD students enrolled in teaching are in the top ten among the universities in Poland at 94.7% (1670/1763) and 97.3% (180/185), respectively [9].

According to the Polish COVID-19 vaccination strategy, education workers received two doses of ChAdOx1 during phase 1 (from February 2021). It consists of a non-replicating adenoviral vector encoding for the SARS-CoV-2 S protein, with a 4–12 week dosing interval [14]. The clinical trials indicated a 76% efficacy after administration of the first dose and 81% after the second dose, with the interval extended to ≥ 12 weeks. Dosing intervals shorter than six weeks resulted in a lower vaccine efficacy, i.e., 55% [15]. An exception was made for medical university lecturers who were simultaneously HCWs who were administered with the BNT162b2 mRNA vaccine in the so-called phase 0 (from December 2020) This vaccine contains nucleoside-modified mRNA encoding for the full-length SARS-CoV-2 S protein encapsulated into lipid nanoparticles, which should be administered in two doses within 21 days [16]. The clinical trials demonstrated a 52% efficacy in preventing COVID-19 after the first vaccine dose and 95% after the full vaccination [17], which lasted up to six months. In our study, both BNT162b2 and ChAdOx1 recipients developed detectable anti-SARS-CoV-2 S IgG antibodies two weeks after the second vaccine dose. However, antibody levels were higher after the BNT162b2 vaccination than after the ChAdOx1 vaccination. In contrast, three months after the two homologous vaccine doses the antibody levels waned more rapidly in the BNT162b2 recipients when compared to the ChAdOx1 vaccinated individuals. Similar trends were observed among the HCWs vaccinated with the BNT126b2 or ChAdOx1 vaccine in Cyprus [18]. Our results are also in line with a large-population-based analysis by Wei et al., who demonstrated that following the homologous BNT162b2 vaccination anti-SARS-CoV-2 S IgG antibodies titres were higher but waned faster over time in comparison to vector vaccination [19,20]. Higher anti-SARS-CoV-2 S antibody titres among the BNT126b2 vaccinated individuals in comparison to the ChAdOx1 recipients were also observed by Barin et al., but in contrast to our results, they found the lowest decline of antibody levels among the mRNA vaccine recipients [21]. What remains unexplained is that in some participants, the post-vaccination antibodies were not detectable three months after the second vaccine dose even though they were present two weeks post-vaccination. The absence of antibodies was more common in the BNT162b2

than in the ChAdOx1 recipients. The BNT162b2 vaccinated group primarily included young and healthy persons, whereas the ChAdOx1 recipients were older and had a greater number of comorbidities. Thus, our results significantly differ from earlier findings, where lower antibody levels after vaccination were associated with comorbidities, male sex, and older age [20,22]. Wei et al. reported that the above-mentioned factors had larger effects on the BNT162b2 response than on the ChAdOx1 response but did not affect the half-life regardless of the vaccine type. The estimated half-life of post-vaccination antibodies was 79 days for ChAdOx1 and 51 days for BNT162b2 [20]. Nevertheless, at present, the cause of the rapid drop in anti-SARS-CoV-2 S IgG antibodies in some participants remains unclear.

In addition to studies focusing on the antibody response after vaccination, several cohort studies were conducted to compare the effectiveness of the ChAdOx1 and BNT162b2 vaccines. Kaura et al. revealed that the SARS-CoV-2 infection incidence rate ratio after a single vaccine dose was higher for ChAdOx1 than for BNT162b2, although the vaccines were equally effective at reducing COVID-19 mortality and hospitalisation rates [23]. Similar observations were made for people who completed the full vaccination, with two doses [23]. At 14–73 days post-vaccination, Hall et al. observed lower effectiveness for ChAdOx1 when compared to the BNT162b2 vaccine, i.e., 58% and 85%, respectively [24]. Two studies conducted five months after the second-dose administration reported higher effectiveness for BNT162b2 than for ChAdOx1 [25,26]. However, Andrews et al. noted that protection against COVID-19-related death and hospitalisation remained high, regardless of the vaccine type [26]. Several groups have found that the rate of decline in vaccine effectiveness was higher in older individuals and those with comorbidities [25–27]. Tartof et al. suggested that reduction in vaccine effectiveness may be a result of waning immunity with time [28].

Due to the above-described depletion of anti-SARS-CoV-2 S antibodies and thus potential weaker protection from severe COVID-19, as well as the emergence of the SARS-CoV-2 omicron variant, a third vaccine dose, the so-called ‘booster’, is recommended by the EMA, the European Center for Disease Prevention, and many other scientific and medical societies. A third vaccine dose was reported to elevate the anti-SARS-CoV-2 S antibody level, increasing the neutralising antibodies titre, and showing activity against all the circulating SARS-CoV-2 variants, thus reducing the risk of infection by 88% to 92% [29–33]. Unfortunately, protection against severe COVID-19 after three vaccine doses wanes in a similar manner to the previous dose, especially among older people with comorbidities and patients on immunosuppressants [34–36]. Therefore, in the case of individuals who are at risk of progression to severe COVID-19, i.e., adults over 60 years of age, immunocompromised individuals, and pregnant women both the EMA and ECDC recommend a fourth vaccine dose (second booster) [37].

Overall, in our study, we did not observe vaccine-specific differences in protection against COVID-19 after two vaccine doses, as both vaccines provided high immunity to SARS-CoV-2 in infection-naïve education workers. No teachers or lecturers included in our study manifested COVID-19 within three months after the full vaccination. Moreover, those vaccinated with ChAdOx1 and included in our study were exposed to unvaccinated and potentially SARS-CoV-2-infected pupils, since the BNT162b2 vaccines were approved for 12–15-year-old children in June 2021, 6–12-year-old children in December 2021, and children below six years of age in November 2022. The low incidence of SARS-CoV-2 infection among those vaccinated with ChAdOx1 may be a result of vaccination as well as the implementation of various prevention strategies, including complete school closures. The duration of school closures depended on the current epidemiological situation and varied by school type. In general, the higher the educational stage, the longer the period of school closure. Primary schools were closed from 9 November 2020 to 17 January 2021 and between 11 March and 30 April 2021 with children having only online classes. In addition, in primary schools when one child became infected with SARS-CoV-2, the entire group was quarantined. However, it should be underlined that there are still considerable uncertainties regarding the role of children in SARS-CoV-2 transmission. A meta-analysis

by Caini et al. suggested a limited viral spread in school settings. In addition, the authors postulated that children were less than half as likely to have been tested seropositive in comparison to adults [38]. The lower susceptibility of children to SARS-CoV-2 transmission relative to adults was also demonstrated in a meta-analysis conducted by Viner et al. [39]. Moreover, several studies have shown that seroprevalence in educational settings reflects the local SARS-CoV-2 infection rate and is probably associated with general community transmission [40–44]. In contrast to primary and secondary schools, teaching at the university level moved almost completely to the remote mode during the first waves of the COVID-19 pandemic, and thus, they should represent a lower SARS-CoV-2 infection risk. However, due to their medical background, the lecturers involved in our study were also involved in fighting the pandemic, e.g., in molecular diagnostics of SARS-CoV-2 infection. Our previous study showed that HCWs are at the highest risk of SARS-CoV-2 infection and are characterised by the highest seroprevalence among the occupational groups [45]. Further, other authors have demonstrated the clinical work environment as a key SARS-CoV-2 infection risk factor [46,47] but have also highlighted that local COVID-19 foci and household contacts may affect seropositivity rates [47,48]. Surprisingly, none of the analysed lecturers were infected with SARS-CoV-2 during the three months after full vaccination, which can be explained by the high efficiency of the BNT126b2 vaccine, as well as good practical preparation, knowledge, experience, and the proper equipment to work with samples from patients potentially infected with SARS-CoV-2.

Any drug may have side effects, and the COVID-19 vaccines are not an exception. Therefore, we analysed the severity of the side effects following the second ChAdOx1 or BNT162b2 vaccine dose. As stated in the BNT162b2 product information, following the second dose, the most frequent adverse reactions were injection site pain, fatigue, and headaches. Less than half of the BNT162b2 recipients experienced myalgia, chills, arthralgia, pyrexia, or injection site swelling. The increased risk of myocarditis in younger males has also been highlighted [16]. In our study, after two BNT162b vaccine doses, adverse effects occurred at much lower frequencies than expected from the published literature and manufacturer's data. At least one side effect, such as fever, headache, fatigue, or chills was observed in 7% of the BNT162b2 recipients. An observational study conducted by Menni et al. in 2021 demonstrated that the incidence of systemic side effects after the second BNT162b2 vaccine dose was lower than that for local side effects (22% versus 69%, respectively), but both were less prevalent than suggested in the product information. A higher local reactogenicity was associated with previous SARS-CoV-2 infection. The side effects were most commonly reported by younger women [49]. Coggins et al. noted a similar trend regarding age and gender in generally healthy and SARS-CoV-2 infection-naïve HCWs. The authors also demonstrated that post-vaccination symptoms were negatively correlated with body weight. In our study, the BNT126b2 vaccinated group consisted mainly of young and healthy lecturers from medical universities who may tend to underestimate symptom intensity. In contrast, the ChAdOx1 vaccine raised more safety concerns. In March 2021, due to thromboembolic events, several countries paused vaccination with ChAdOx1. Many resumed the use of vaccines following the EMA's safety committee statement that the benefit of ChAdOx1 vaccination in protecting against COVID-19 outweighs the risks [50]. According to ChAdOx1 product information, the most commonly reported adverse reactions are injection site tenderness and pain, headaches, and fatigue. In less than half of the cases, myalgia, malaise, pyrexia, chills, arthralgia, and nausea are observed. Thrombosis with thrombocytopenia syndrome was reported as a very rare case [14]. In our research, in contrast to the BNT162b2 group, systemic reactogenicity was more common and severe after two doses of ChAdOx1. The majority (77%) of the ChAdOx1 recipients experienced multiple adverse reactions, such as fever, muscle and joint pain, headache, fatigue, chills, pain at the injection site, diarrhoea, or vomiting. Warkentin et al. reported at least a reaction in 58% of ChAdOx1 recipients, 70% of whom had pre-existing diseases. In addition, higher reactogenicity was observed among women and younger people; in contrast, 72% of the ChAdOx1 recipients in a smaller study conducted by Marking et al. did not report any

adverse effect [51]. Teachers vaccinated with ChAdOx1 are older and many suffer from underlying diseases, so they may pay greater attention to their health after vaccination. Notably, as side-effects studies rely mostly on self-reported data, we may assume that this could lead to information bias among different studies and population groups.

5. Conclusions

In conclusion, the strengths of our study include the comparison of antibody responses to ChAdOx1 and BNT162b2 homologous vaccination in terms of effectiveness, safety, and antibody levels at two time points. We also evaluated both the prevention and control measures implemented in educational settings, which altogether, allowed us to estimate immunity in two groups of teachers. We are aware that our study has limitations. It includes a relatively small sample size as well as age and gender disparities. On the other hand, the majority of school teachers in Poland are women (88%), of which 62% are over 40 years old [52]. In fact, our study reflects the demographics of education workers, thus providing an insight into the COVID-19 immunity status of this group. Another limitation is the relatively short follow-up. Further data collection would be needed to determine exactly how changes in IgG antibody levels over a longer period affect the protection against SARS-CoV-2 infection. It should also be highlighted that our research focuses on antibody responses. Studying other mechanisms, such as memory T-cells may enhance our understanding of vaccine-induced immunity. Lastly, due to the very high vaccination rate, we were unable to collect samples from the non-vaccinated teachers, which could serve as a control group in comparison to the vaccine effectiveness and SARS-CoV-2 infection risk.

Author Contributions: Conceptualization, Ł.K. and P.Z.; validation, D.L., R.N. and M.J.; investigation, D.L., R.N. and M.J.; writing—original draft preparation, D.L. and P.Z.; supervision, P.Z.; funding acquisition, P.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the National Science Centre (Poland), grants numbers UMO-2020/01/0/NZ6/00152 and UMO/2018/31/F/NZ1/03891.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20, 17 June 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available within this article.

Acknowledgments: The authors would like to thank Galyna Rayevska and Ihor Nikolaienko from Vitrotest Europe for providing the SARS-CoV-2 IgG Quantispike assays and helpful technical comments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 14 November 2022).
2. Barouch, D.H. Covid-19 vaccines—immunity, variants, boosters. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 1011–1020. [CrossRef] [PubMed]
3. Tregoning, J.S.; Flight, K.E.; Higham, S.L.; Wang, Z.; Pierce, B.F. Progress of the COVID-19 vaccine effort: Viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 626–636. [CrossRef] [PubMed]
4. Khandker, S.S.; Godman, B.; Jawad, M.I.; Meghla, B.A.; Tisha, T.A.; Khondoker, M.U.; Haq, M.A.; Charan, J.; Talukder, A.A.; Azmuda, N.; et al. A systematic review on COVID-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. *Vaccines* **2021**, *9*, 1387. [CrossRef]
5. COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed on 14 November 2022).
6. EMA. Safety of COVID-19 Vaccines. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/safety-covid-19-vaccines> (accessed on 14 November 2022).

7. Wang, B.; Ping, Y. A comparative analysis of COVID-19 vaccination certificates in 12 countries/regions around the world: Rationalising health policies for international travel and domestic social activities during the pandemic. *Health Policy* **2022**, *126*, 755–762. [CrossRef]
8. Duan, Y.; Shi, J.; Wang, Z.; Zhou, S.; Jin, Y.; Zheng, Z.-J. Disparities in COVID-19 vaccination among low-, middle-, and high-income countries: The mediating role of vaccination policy. *Vaccines* **2021**, *9*, 905. [CrossRef]
9. Narodowy Program Szczepień Przeciw COVID-19. Available online: <https://www.gov.pl/web/szczepimysie/narodowy-program-szczepien-przeciw-covid-19> (accessed on 22 August 2022).
10. Huang, Y.; Yang, C.; Xu, X.; Xu, W.; Liu, S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1141–1149. [CrossRef]
11. Watanabe, Y.; Mendonça, L.; Allen, E.R.; Howe, A.; Lee, M.; Allen, J.D.; Chawla, H.; Pulido, D.; Donnellan, F.; Davies, H.; et al. Native-like SARS-CoV-2 spike glycoprotein expressed by ChAdOx1 NCoV-19/AZD1222 vaccine. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 594–602. [CrossRef]
12. Xia, X. Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines. *Vaccines* **2021**, *9*, 734. [CrossRef] [PubMed]
13. Mapa Zarażeń—COVID-HUB. Available online: <https://covidhub.psnc.pl/mapa/> (accessed on 25 July 2022).
14. Vaxzevria, COVID 19 Vaccine (ChAdOx1 S [Recombinant]). Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-product-information_pl.pdf (accessed on 22 November 2022).
15. Voysey, M.; Clemens, S.A.C.; Madhi, S.A.; Weckx, L.Y.; Folegatti, P.M.; Aley, P.K.; Angus, B.; Baillie, V.L.; Barnabas, S.L.; Bhorat, Q.E.; et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 NCoV-19 (AZD1222) vaccine: A pooled analysis of four randomised trials. *Lancet* **2021**, *397*, 881–891. [CrossRef]
16. Covid, P.-B. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting December 10, 2020. Available online: <https://www.fda.gov/media/144245/download> (accessed on 22 November 2022).
17. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [CrossRef]
18. Deeba, E.; Krashias, G.; Constantinou, A.; Koptides, D.; Lambrianides, A.; Christodoulou, C. Evaluation of S1RBD-Specific IgG antibody responses following COVID-19 vaccination in healthcare professionals in Cyprus: A comparative look between the vaccines of Pfizer-BioNTech and AstraZeneca. *Microorganisms* **2022**, *10*, 967. [CrossRef] [PubMed]
19. Wei, J.; Stoesser, N.; Matthews, P.C.; Ayoubkhani, D.; Studley, R.; Bell, I.; Bell, J.I.; Newton, J.N.; Farrar, J.; Diamond, I.; et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 vaccines in 45,965 adults from the general population of the United Kingdom. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 1140–1149. [CrossRef] [PubMed]
20. Wei, J.; Pouwels, K.B.; Stoesser, N.; Matthews, P.C.; Diamond, I.; Studley, R.; Rourke, E.; Cook, D.; Bell, J.I.; Newton, J.N.; et al. Antibody responses and correlates of protection in the general population after two doses of the ChAdOx1 or BNT162b2 vaccines. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 1072–1082. [CrossRef] [PubMed]
21. Barin, B.; Kasap, U.; Selçuk, F.; Volkan, E.; Uluçkan, Ö. Comparison of SARS-CoV-2 anti-spike receptor binding domain IgG antibody responses after CoronaVac, BNT162b2, ChAdOx1 COVID-19 vaccines, and a single booster dose: A prospective, longitudinal population-based study. *Lancet Microbe* **2022**, *3*, e274–e283. [CrossRef] [PubMed]
22. Ward, H.; Whitaker, M.; Flower, B.; Tang, S.N.; Atchison, C.; Darzi, A.; Donnelly, C.A.; Cann, A.; Diggle, P.J.; Ashby, D.; et al. Population antibody responses following COVID-19 vaccination in 212,102 individuals. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 907. [CrossRef] [PubMed]
23. Kaura, A.; Trickey, A.; Shah, A.S.V.; Benedetto, U.; Glampson, B.; Mulla, A.; Mercuri, L.; Gautama, S.; Costelloe, C.E.; Goodman, I.; et al. Comparing the longer-term effectiveness of a single dose of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccines across the age spectrum. *eClinicalMedicine* **2022**, *46*, 101344. [CrossRef]
24. Hall, V.; Foulkes, S.; Insalata, F.; Kirwan, P.; Saei, A.; Atti, A.; Wellington, E.; Khawam, J.; Munro, K.; Cole, M.; et al. Protection against SARS-CoV-2 after Covid-19 vaccination and previous infection. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1207–1220. [CrossRef]
25. Menni, C.; May, A.; Polidori, L.; Louca, P.; Wolf, J.; Capdevila, J.; Hu, C.; Ourselin, S.; Steves, C.J.; Valdes, A.M.; et al. COVID-19 Vaccine waning and effectiveness and side-effects of boosters: A prospective community study from the ZOE COVID study. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 1002–1010. [CrossRef]
26. Andrews, N.; Tessier, E.; Stowe, J.; Gower, C.; Kirsebom, F.; Simmons, R.; Gallagher, E.; Thelwall, S.; Groves, N.; Dabrera, G.; et al. Duration of protection against mild and severe disease by COVID-19 vaccines. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 340–350. [CrossRef]
27. Nordström, P.; Ballin, M.; Nordström, A. Risk of infection, hospitalisation, and death up to 9 months after a second dose of COVID-19 vaccine: A retrospective, total population Cohort Study in Sweden. *Lancet* **2022**, *399*, 814–823. [CrossRef]
28. Tartof, S.Y.; Slezak, J.M.; Fischer, H.; Hong, V.; Ackerson, B.K.; Ranasinghe, O.N.; Frankland, T.B.; Ogun, O.A.; Zamparo, J.M.; Gray, S.; 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*, 1407–1416. [CrossRef] [PubMed]

29. Petrelli, F.; Luciani, A.; Borgonovo, K.; Ghilardi, M.; Parati, M.C.; Petrò, D.; Lonati, V.; Pesenti, A.; Cabiddu, M. Third dose of SARS-CoV-2 vaccine: A systematic review of 30 published studies. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 2837–2844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Barda, N.; Dagan, N.; Cohen, C.; Hernán, M.A.; Lipsitch, M.; Kohane, I.S.; Reis, B.Y.; Balicer, R.D. Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: An observational study. *Lancet Lond. Engl.* **2021**, *398*, 2093–2100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Moreira, E.D.; Kitchin, N.; Xu, X.; Dychter, S.S.; Lockhart, S.; Gurtman, A.; Perez, J.L.; Zerbini, C.; Dever, M.E.; Jennings, T.W.; et al. Safety and efficacy of a third dose of BNT162b2 COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1910–1921. [[CrossRef](#)]
32. Saciuk, Y.; Kertes, J.; Shamir Stein, N.; Ekka Zohar, A. Effectiveness of a third dose of BNT162b2 mRNA vaccine. *J. Infect. Dis.* **2022**, *225*, 30–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yorsaeng, R.; Suntronwong, N.; Phowattanasathian, H.; Assawakosri, S.; Kanokudom, S.; Thongmee, T.; Vichaiwattana, P.; Auphimai, C.; Wongsrisang, L.; Srimuan, D.; et al. Immunogenicity of a third dose viral-vectored COVID-19 vaccine after receiving two-dose inactivated vaccines in healthy adults. *Vaccine* **2022**, *40*, 524–530. [[CrossRef](#)]
34. Hall, V.G.; Ferreira, V.H.; Ku, T.; Ierullo, M.; Majchrzak-Kita, B.; Chaparro, C.; Selzner, N.; Schiff, J.; McDonald, M.; Tomlinson, G.; et al. Randomized trial of a third dose of mRNA-1273 vaccine in transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1244–1246. [[CrossRef](#)]
35. Bensouna, I.; Caudwell, V.; Kubab, S.; Acquaviva, S.; Pardon, A.; Vittoz, N.; Bozman, D.-F.; Hanafi, L.; Faucon, A.-L.; Housset, P. SARS-CoV-2 antibody response after a third dose of the BNT162b2 vaccine in patients receiving maintenance hemodialysis or peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **2022**, *79*, 185–192.e1. [[CrossRef](#)]
36. Pappas, G.; Saloustros, E.; Boutis, A.; Tsoukalas, N.; Nikolaou, M.; Christopoulou, A.; Agelaki, S.; Boukovinas, I.; Ardavanis, A.; Saridaki, Z. Vaccine third dose and cancer patients: Necessity or luxury? *ESMO Open* **2021**, *6*, 100306. [[CrossRef](#)]
37. EMA. ECDC and EMA Update Recommendations on Additional Booster Doses of mRNA COVID-19 Vaccines. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ecdc-ema-update-recommendations-additional-booster-doses-mrna-covid-19-vaccines> (accessed on 21 November 2022).
38. Caini, S.; Martinoli, C.; La Vecchia, C.; Raimondi, S.; Bellerba, F.; D'Ecclesiis, O.; Sasso, C.; Basso, A.; Cammarata, G.; Gandini, S. SARS-CoV-2 circulation in the school setting: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 5384. [[CrossRef](#)]
39. Viner, R.M.; Mytton, O.T.; Bonell, C.; Melendez-Torres, G.J.; Ward, J.; Hudson, L.; Waddington, C.; Thomas, J.; Russell, S.; van der Klis, F.; et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 infection among children and adolescents compared with adults: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr.* **2021**, *175*, 143–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Boey, L.; Roelants, M.; Merckx, J.; Hens, N.; Desombere, I.; Duysburgh, E.; Vandermeulen, C. Age-Dependent Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in school-aged children from areas with low and high community transmission. *Eur. J. Pediatr.* **2022**, *181*, 571–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ismail, S.A.; Saliba, V.; Lopez Bernal, J.; Ramsay, M.E.; Ladhani, S.N. SARS-CoV-2 infection and transmission in educational settings: A prospective, cross-sectional analysis of infection clusters and outbreaks in England. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 344–353. [[CrossRef](#)]
42. Goldfarb, D.M.; Mâsse, L.C.; Watts, A.W.; Hutchison, S.M.; Muttucomaroe, L.; Bosman, E.S.; Barakauskas, V.E.; Choi, A.; Dhillon, N.; Irvine, M.A.; et al. SARS-CoV-2 seroprevalence among Vancouver public school staff in British Columbia, Canada: A cross-sectional study. *BMJ Open* **2022**, *12*, e057846. [[CrossRef](#)]
43. Ladhani, S.N.; Ireland, G.; Baawuah, F.; Beckmann, J.; Okike, I.O.; Ahmad, S.; Garstang, J.; Brent, A.J.; Brent, B.; Walker, J.; et al. SARS-CoV-2 infection, antibody positivity and seroconversion rates in staff and students following full reopening of secondary schools in England: A prospective Cohort Study, September–December 2020. *eClinicalMedicine* **2021**, *37*, 100948. [[CrossRef](#)]
44. Ladhani, S.N.; Ireland, G.; Baawuah, F.; Beckmann, J.; Okike, I.O.; Ahmad, S.; Garstang, J.; Brent, A.J.; Brent, B.; Aiano, F.; et al. Emergence of the delta variant and risk of SARS-CoV-2 infection in secondary school students and staff: Prospective surveillance in 18 schools, England. *eClinicalMedicine* **2022**, *45*, 101319. [[CrossRef](#)]
45. Lorent, D.; Nowak, R.; Luwański, D.; Pisarska-Krawczyk, M.; Figlerowicz, M.; Zmora, P. The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—Before and after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. *Vaccines* **2022**, *10*, 1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ebinger, J.E.; Joung, S.; Liu, Y.; Wu, M.; Weber, B.; Claggett, B.; Botting, P.G.; Sun, N.; Driver, M.; Kao, Y.H.; et al. Demographic and clinical characteristics associated with variations in antibody response to BNT162b2 COVID-19 vaccination among healthcare workers at an academic medical centre: A longitudinal Cohort Analysis. *BMJ Open* **2022**, *12*, e059994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Piccoli, L.; Ferrari, P.; Piumatti, G.; Jovic, S.; Rodriguez, B.F.; Mele, F.; Giacchetto-Sasselli, I.; Terrot, T.; Silacci-Fregni, C.; Cameroni, E.; et al. Risk assessment and seroprevalence of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers of COVID-19 and non-COVID-19 hospitals in Southern Switzerland. *Lancet Reg. Health–Eur.* **2021**, *1*, 100013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Galanis, P.; Vraika, I.; Fragkou, D.; Bilali, A.; Kaitelidou, D. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and associated factors in healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *108*, 120–134. [[CrossRef](#)]

49. Menni, C.; Klaser, K.; May, A.; Polidori, L.; Capdevila, J.; Louca, P.; Sudre, C.H.; Nguyen, L.H.; Drew, D.A.; Merino, J.; et al. Vaccine side-effects and SARS-CoV-2 infection after vaccination in users of the COVID symptom study app in the UK: A prospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 939–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. EMA. COVID-19 Vaccine AstraZeneca: Benefits Still Outweigh the Risks despite Possible Link to Rare Blood Clots with Low Platelets. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-vaccine-astrazeneca-benefits-still-outweigh-risks-despite-possible-link-rare-blood-clots> (accessed on 21 November 2022).
51. Marking, U.; Havervall, S.; Greilert-Norin, N.; Ng, H.; Blom, K.; Nilsson, P.; Phillipson, M.; Hober, S.; Nilsson, C.; Mangsbo, S.; et al. Duration of SARS-CoV-2 immune responses up to six months following homologous or heterologous primary immunization with ChAdOx1 NCoV-19 and BNT162b2 mRNA vaccines. *Vaccines* **2022**, *10*, 359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nauczyciele Wg Wiek, Płci, Typu Podmiotu i Województw w Roku Szkolnym 2020/2021—Otwarte Dane. Available online: https://dane.gov.pl/pl/dataset/811,nauczyciele-w-osobach-i-etatach/resource/31197/table?page=1&per_page=20&q=&sort= (accessed on 21 November 2022).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Level and COVID-19 Vaccine Boosters among Healthcare Workers with the Highest SARS-CoV-2 Infection Risk—Follow Up Study

Dagny Lorent ¹, Rafał Nowak ¹, Magdalena Figlerowicz ², Luiza Handschuh ¹ and Paweł Zmora ^{1,*}

¹ Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland; dlorent@ibch.poznan.pl (D.L.); rnowak@ibch.poznan.pl (R.N.); luizahan@ibch.poznan.pl (L.H.)

² Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Poznan University of Medical Sciences, 61-701 Poznan, Poland; mfiglerowicz@ump.edu.pl

* Correspondence: pzmora@ibch.poznan.pl; Tel.: +48-61-852-8503

Abstract: During the COVID-19 pandemic, several vaccines were developed to limit the spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). However, due to SARS-CoV-2 mutations and uneven vaccination coverage among populations, a series of COVID-19 waves have been caused by different variants of concern (VOCs). Despite the updated vaccine formulations for the new VOC, the benefits of additional COVID-19 vaccine doses have raised many doubts, even among high-risk groups such as healthcare workers (HCWs). We examined the factors underlying hesitancy to receive COVID-19 booster vaccine doses and analysed the anti-SARS-CoV-2 IgG antibody response after booster vaccination among HCWs. Our study found that 42% of the HCWs were hesitant about the second booster dose, while 7% reported no intent to get vaccinated with any additional doses. As reasons for not vaccinating, participants most frequently highlighted lack of time, negative experiences with previous vaccinations, and immunity conferred by past infections. In addition, we found the lowest post-vaccination antibody titres among HCWs who did not receive any vaccine booster dose and the highest among HCWs vaccinated with two booster doses.

Keywords: vaccination; healthcare workers; hesitancy; booster dose; COVID-19; Poland



Citation: Lorent, D.; Nowak, R.; Figlerowicz, M.; Handschuh, L.; Zmora, P. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Level and COVID-19 Vaccine Boosters among Healthcare Workers with the Highest SARS-CoV-2 Infection Risk—Follow Up Study. *Vaccines* **2024**, *12*, 475. <https://doi.org/10.3390/vaccines12050475>

Academic Editor: Christian Napoli

Received: 17 April 2024

Revised: 26 April 2024

Accepted: 27 April 2024

Published: 29 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

According to the Hippocratic oath ‘*Morbum evitare quam curare facilius est*’, it is better to prevent than to treat disease. The best way to prevent the spread and pathogenesis of infectious disease agents is vaccination. There are different types of vaccines, which may contain attenuated, inactivated or dead pathogens, as well as purified products derived from them or fragments of their genetic material encoding the antigens [1]. In addition, there are different vaccination schemes that differ in their number of doses, the time between each dose, the administration route, etc. [1]. Lastly, the medical recommendations regarding vaccinations may change due to newly acquired knowledge [2].

According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), four million deaths worldwide are prevented by childhood vaccination every year [3]. Moreover, it was estimated that more than 50 million deaths could be prevented through immunisation between 2021 and 2030 [3]. Over the next 10 years, measles and hepatitis B vaccinations can save nearly 19 and 14 million lives, respectively [3]. Finally, it was estimated that vaccinations prevented almost 20 million deaths from coronavirus disease 2019 (COVID-19) worldwide in the first year after vaccine approval [4].

However, tackling the vaccine-preventable diseases is mostly limited by vaccine hesitancy. In January 2019, even before the COVID-19 pandemic outbreak, the World Health Organisation (WHO) identified vaccine hesitancy among ten threats to global health [5]. Importantly, they also pointed out three groups of viruses that may pose pandemic or

epidemic risk such as influenza viruses, Ebola viruses (and other high-threat pathogens like several haemorrhagic fevers, Zika, Nipah, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), and Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV), as well as unknown emerging infectious disease pathogens), and human immunodeficiency virus (HIV) [5]. Although vaccination plays a crucial role in preventing viral infections and transmission, the reasons for vaccine hesitancy remain unclear. WHO research recognised complacency, vaccine access inconvenience and general distrust as main factors influencing vaccine acceptance [5]. As a result, there is a huge discrepancy between the vaccination coverage recommended by WHO and the actual rate of vaccination. For example, in 2003 the WHO's plan for influenza vaccination was to achieve 50% vaccination coverage among the elderly by 2006 and increase it to 75% by 2010 [5]. In 2009, the European Council recommended increasing the vaccination rate among risk groups, including healthcare workers (HCWs) [6]. Research by Sprujit et al. on 14 European countries until the 2013/2014 season revealed that median influenza vaccination rates in the general population were low overall, whereas rates among the elderly were higher and close to the threshold recommended by the WHO (1% to 27% and 2% to 81%, respectively). Regardless of the study period, ranging from 8 to 23 seasons in different countries, the observed vaccination coverage trend rose slightly initially, but began to decline after the 2009 A/H1N1 pandemic year. This pattern was observed in both the total population and the elderly [7]. A global meta-analysis of influenza vaccination showed the highest vaccination rates in the general population during the COVID-19 pandemic (27.63%), followed by other influenza seasons (25.48%) and the 2009 A/H1N1 pandemic (20.41%). Similarly, the largest number of vulnerable people was vaccinated during the COVID-19 pandemic (48.52% of HCWs and 54.59% of the chronically ill), but none of them reached the WHO target. The opposite trend was observed for other periods, with more HCWs and chronically ill persons vaccinated during the 2009 A/H1N1 pandemic (38.98% and 42.75%, respectively) than other influenza seasons (33.95% and 40.69%, respectively) [8]. In Poland, based on the National Institute of Public Health—National Hygiene Institute and vaccine distributors' data, it is estimated that since the 2011/2012 season the influenza vaccination rate was the highest during the COVID-19 pandemic and reached its peak in 2021–2022, with 7% of the general population and 22.9% of the elderly vaccinated, but after this year it started declining. From the 2011/2012 season to the 2018/2019 season the vaccination coverage slowly declined and started increasing in the 2017/2018 season. Nevertheless, a low median vaccination rate was observed during this time in both the general population (3.7%) and the elderly (12.1%), which did not change considerably (by 1.2% in the general population and 2.8% among the elderly) [9].

Overall, the obtained data show discrepancies between vaccination coverage in general and susceptible groups, as well as in different countries [7,8]. However, the lack of detailed official data from each country [5,10] only provides general conclusions, but does not allow us to tailor vaccination campaigns to specific countries and groups. As indicated by WHO, influenza vaccination uptake is related to different factors that are strongly country and context-dependent [5]. This highlights the need to monitor vaccination rate and hesitancy at specific settings, with particular attention to HCWs, in order to address the problem of vaccination coverage.

One year after the emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and its global spread, there were four COVID-19 vaccines available in the European Union: BNT162b2 (Pfizer, New York, NY, USA—BioNTech, Mainz, Germany), mRNA-1273 (Moderna, Cambridge, MA, USA), and ChAdOx1-S (AstraZeneca, Cambridge, UK/University of Oxford, Oxford, UK), which were required to be administered in two doses, and one shot Ad26.COV2.S (Janssen Pharmaceutical Companies, Beerse, Belgium). Due to the anti-SARS-CoV-2 antibody waning [11] and relatively little knowledge on the role of memory cell in the re- or post-vaccination infection, the European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) and European Medical Agency (EMA) in 2022 recommended the first booster dose mainly for the individuals with severe COVID-19

high risk, such as elderly individuals, as well as for people with high risk of SARS-CoV-2 infection, i.e., HCWs [10]. Furthermore, due to the emergence of the SARS-CoV-2 omicron genetic variant with the ability to escape the immune system, a second booster dose was recommended [10]. Currently in Poland, there are three booster vaccines available: BNT162b2 BA.4-5 (Pfizer, New York, NY, USA—BioNTech, Mainz, Germany), mRNA-1273 BA.1 (Moderna, Cambridge, MA, USA) and NVX-CoV2373 (Novavax, Gaithersburg, MA, USA).

In our previous study [12], we assessed anti-SARS-CoV-2 S Ab levels after completion of a mandatory COVID-19 primary vaccination series among HCWs in February 2021. Within seven months of vaccination we observed that the Ab level decreased by approximately 90–95%; however, none of the HCWs contracted COVID-19. During that period, Alpha VOC had been the major lineage in Poland and was replaced by the Delta VOC in July 2021 [13]. In addition, we revealed that early in the pandemic (September 2020) none of the HCWs was infected with SARS-CoV-2, regardless of the occupational risk for SARS-CoV-2 infection. Interestingly, at the end of the pre-VOC time (December 2020), almost a two times-higher seroprevalence was detected among the HCWs from the low infection risk unit than from the high infection risk unit. Thus, we concluded that awareness and training of HCWs from the infectious disease unit may contribute to the reduction of SARS-CoV-2 transmission in healthcare settings, even in the absence of a vaccine. Considering both the rapid waning of vaccination-induced anti-SARS-CoV-2 S Ab levels after the primary vaccination schedule and the effectively implemented non-pharmaceutical interventions, we aimed to re-examine the attitude of the HCWs from the infectious disease unit toward a non-compulsory booster vaccination. The updated booster vaccines, released by Pfizer—BioNTech and Moderna, were designed to target the rapidly spreading Omicron VOC by producing not only S protein from the original strain of SARS-CoV-2, but also from the Omicron BA.1 subvariant or both the Omicron BA.4 and the Omicron BA.5 subvariants of SARS-CoV-2 [10]. Bivalent vaccines were available for HCWs in Poland in September 2021, two months earlier than for the general population [9]. Since February 2022, the Omicron VOC has expanded in Poland, accompanied with surges of new COVID-19 cases at the highest level during the COVID-19 pandemic to date [13]. In response to the increased transmissibility of the Omicron VOC and the higher risk of contracting severe COVID-19 for those in vulnerable groups, the second booster dose in Poland was firstly available for the elderly over 80 years of age in April 2022, followed by HCWs in August 2022, and people over 12 years of age one month later [9]. Here, we present the follow up study which focuses on the anti-SARS-CoV-2 Ab titres after booster immunisation and the COVID-19 vaccine booster hesitancy among HCWs from the high infection risk healthcare unit.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants and Design

We invited HCWs from the Department of Infectious Diseases and Child Neurology (DIDaCN) and collaborating units, K. Jonscher's Clinical Hospital, Poznan University of Medical Sciences, Poznan to participate in our study. The invitation was sent by email to all HCWs with basic information on the aim and objectives of this study. In addition, the invitation was spread among HCWs during daily routine meetings. We used only one inclusion criterium, i.e., high risk of SARS-CoV-2 infection connected to the work with COVID-19-positive patients. There were no exclusion criteria.

All participants were asked to answer an online epidemiological survey to collect demographic (sex, age, and profession) and health status (chronic disease and previous SARS-CoV-2 infection) data. Moreover, since receiving COVID-19 booster doses was publicly encouraged, but not mandatory for HCWs in Poland, we asked them whether they received vaccine boosters, how many doses were administered, as well as what reasons underlying vaccination hesitancy. Interviewees could choose from a list of motives for their vaccine hesitancy (i.e., no trust in the vaccine safety; some medical reasons; no time;

previous SARS-CoV-2 infection and its severity) and/or fill in their own answers. To avoid additional bias related to the availability of the COVID-19 vaccine booster doses, we invited the study participants to fill the online survey and donate blood at a time when the booster vaccination was fully available and the time from registration to vaccination was shorter than one day.

Blood specimens were drawn by trained nurses at the DIDaCN in November 2022, i.e., approximately one year after the first COVID-19 vaccine booster and two months after the second vaccine booster dose administration. Following collection, the blood samples were transported to the IBCH PAS for serological assays. In order to differentiate between the Ab response induced by natural infection or vaccination we used immunoassays targeting two SARS-CoV-2 proteins: spike (S) and nucleocapsid (NCP). COVID-19 vaccines are based on S protein, so the increased anti-S Ab level is observed in both vaccinated and SARS-CoV-2 infected persons. On the contrary, anti-NCP Ab are produced only after SARS-CoV-2 infection and their elevated level is the indicator of previous natural exposure to SARS-CoV-2

2.2. Laboratory Analysis

Serological testing for IgG Ab to the S protein and NCP protein was performed using a quantitative anti-SARS-CoV-2 QuantiVac IgG ELISA test (EuroImmun GmbH, Lübeck, Germany) and anti-SARS-CoV-2 NCP IgG ELISA test (EuroImmun GmbH, Lübeck, Germany), respectively. The presence of anti-S IgG Ab confirmed the response to either prior SARS-CoV-2 infection or vaccination, while the presence of anti-NCP IgG Ab indicated only previous SARS-CoV-2 infection. Assays were carried out and interpreted as described in the manufacturer's manuals. Results were calibrated into WHO international units (binding antibody unit, BAU/mL) using the attached reference material and calibration curve. For each run, a new calibration curve was obtained and used for calculations. Analysis included HCWs with anti-SARS-CoV-2 IgG Ab measurement within 389 ± 29 days after the first or 44 ± 11 days after their second BNT162b2 booster vaccination. The time between the completing of primary homologous BNT162b2 vaccination series and anti-SARS-CoV-2 IgG Ab measurements was more than 18 months for HWCs who did not receive any BNT162b2 booster dose.

2.3. Statistical Analysis

The categorical variables were presented as counts and percentages, and the seroprevalence estimates were presented with the 95% CI calculated using the hybrid Wilson/Brown method. Further analyses were conducted with two-way ANOVA with the Tukey post-hoc test with the following within-subject factors: sex (female or male); age (<30, 31–40, 41–50, 51–60 or >60); occupation (physician, nurse/midwife or other); COVID-19 history (positive or negative); chronic diseases (yes or no); and anti-SARS-CoV-2 S IgG level (no vaccine boosters, one dose or two doses of vaccine boosters). The interaction between analysed factors was not included. Data were accepted as statistically different if $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 10 software.

2.4. Ethics Approval

The study was approved by the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20 from 17 June 2019). In addition, written informed consent was obtained from each study participant before blood collection.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Participants

The study group included 69 HCWs (Table 1), of whom the vast majority took part in our previous study on the anti-SARS-CoV-2 antibody level [12]. Most participants were women (84.06%) and were aged 41.44 ± 13.71 years. Nurses and midwives represented 43.48% of study participants, followed by physicians (27.53%), other health associate

professionals (20.29%), and administration staff (8.7%) (Table 1). At the time of enrolment, 47 participants (68.12%) reported a previous laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection and 31 (44.93%) suffered from at least one comorbidity (Table 1).

Table 1. The COVID-19 booster vaccination among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk.

Category	Participants		Booster Vaccination		
	(n)	(%)	None (%, 95% CI)	One Dose (%, 95% CI)	Two Doses (%, 95% CI)
Overall	69	100	7.25 ^a (2.39–16.11)	42.02 ^b (30.24–54.52)	50.73 ^b (38.41–62.98)
Gender					
Female	58	84.06	6.90 ^a (1.91–16.73)	50.00 ^b (36.58–63.42)	43.10 ^b (30.16–56.77)
Male	11	15.94	9.09 ^a (0.23–41.28)	0.00 ^{ab} (0.00–28.49) *	90.91 ^b (58.72–99.77)
Age					
19–30 y.o.	20	28.99	10.00 ^a (1.24–31.07)	35.00 ^{ab} (15.39–59.22)	55.00 ^b (31.53–76.94)
31–40 y.o.	12	17.39	8.33 ^a (0.21–38.48)	16.67 ^{ab} (2.09–48.41)	75.00 ^b (42.81–94.51)
41–50 y.o.	13	18.84	7.69 (0.19–36.03)	61.54 (31.58–86.14)	30.77 (9.09–61.43)
51–60 y.o.	20	26.09	5.00 ^a (0.13–24.87)	25.00 ^{ab} (8.66–49.10)	70.00 ^b (45.72–88.11)
>60 y.o.	4	8.70	0.00 (0.00–60.24)	0.00 (0.00–60.24)	100.00 (39.76–100.00) *
Occupation					
Physicians	19	27.53	5.26 ^a (0.13–26.03)	15.79 ^{ab} (3.38–39.58)	78.95 ^b (54.43–93.95)
Nurses/Midwives	30	43.48	6.67 ^a (0.82–22.07)	53.33 ^b (34.33–71.66)	40.00 ^b (22.66–59.40)
Administration	6	8.70	16.67 (0.42–64.12)	50.00 (11.81–88.19)	33.33 (4.33–77.72)
Others	14	20.29	7.14 (0.18–33.87)	42.86 (17.66–71.14)	50.00 (23.04–76.96)
COVID-19 history					
Positive results	47	68.12	10.64 ^a (3.55–23.10)	38.30 ^b (24.51–53.62)	51.06 ^b (36.06–65.92)
Negative results	22	31.88	0.00 ^a (0.00–15.44) *	50.00 ^b (28.22–71.78)	50.00 ^b (28.22–71.78)
Chronic diseases					
Yes	31	44.93	6.45 ^a (0.79–21.42)	38.71 ^b (21.85–57.81)	54.84 ^b (36.03–72.68)
No	38	55.07	7.89 ^a (1.66–21.38)	44.74 ^b (28.62–61.70)	47.37 ^b (30.98–64.18)

* one-sided 97.5% confidence interval; ^{a,b}—values within a row with different superscript letters differ $p < 0.05$.

3.2. Prevalence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies among Healthcare Workers

For this project, we analysed the prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies after natural infection (anti-NCP) and after the anti-COVID-19 BNT126b2 vaccination (anti-S). A positive result of a SARS-CoV-2 diagnostic test in the past was reported by 47 study participants. Among them, we found anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies in 20 individuals. In 27 HCWs, the anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies were depleted. Seven individuals had developed anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies without declaring COVID-19 in their history. The prevalence of anti-SARS-CoV-2 NCP antibodies increased from 5.71% in September 2021 [12] to 39.1% in November 2022.

Post-vaccination antibodies were found in 68 of the 69 analysed HCWs, and the prevalence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies increased from 84.50% in September 2021 [12] to 98.56% in November 2022. Among these HCWs, there was one individual with a complete depletion of anti-SARS-CoV-2 S antibodies. The lowest anti-SARS-CoV-2 S antibody levels, i.e., 836.60 ± 686.04 BAU/mL, were found among individuals who had not received any vaccine booster dose (Figure 1). The highest post-vaccination antibody titre, i.e., 3990.17 ± 2053.16 BAU/mL, was observed in study participants who received two COVID-19 vaccine boosters (Figure 1).

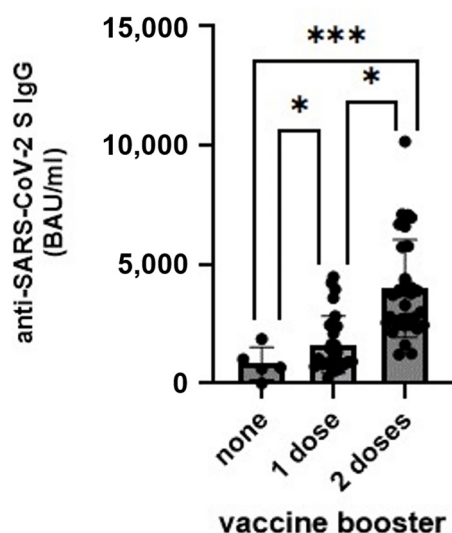


Figure 1. The anti-SARS-CoV-2 S antibodies level among healthcare workers who received none, one or two doses of COVID-19 vaccine boosters. Statistical analyses were conducted with two-way ANOVA with the Tukey post-hoc test. BAU—binding antibody units, each dot represents one study participant, *— $p < 0.05$, ***— $p < 0.001$.

3.3. The Vaccine Boosters among Healthcare Workers

At the time of enrolment, all HCWs had received the recommended two basic doses of BNT162b2 vaccines (Pfizer—BioNTech) in January/February 2021. The vast majority of study participants (92.75%) had received at least one dose of vaccine booster, with two doses of vaccine booster administered to 50.73% of the analysed individuals (Table 1). Interestingly, all HCWs with no previously confirmed SARS-CoV-2 infection had received at least one vaccine booster dose. Only 5 of 69 HCWs had not received any vaccine booster (Table 1). The highest number of HCWs without any vaccine boosters was observed among administration personnel (Table 1).

Participants in the 31–40 and 41–50 age groups were the most sceptical about the second booster dose (75% and 62%, respectively). Booster hesitancy among health professionals (physicians, nurses and midwives) was lower than among administrative staff and others. Almost 79% of the physicians had received two COVID-19 vaccine booster doses. However, apart from physicians, about half of the HCWs from each occupation group were hesitant about the second booster dose.

In total, 34 of the 69 HCWs provided reasons for COVID-19 booster vaccination hesitancy (Figure 2). Interviewees reported more than one reason. Three of five participants who did not receive any booster shots and 5 of 29 who had received only one booster preferred not to comment on their unwillingness to get the booster doses. Four HCWs planned to get the second booster dose once they were eligible for vaccination.

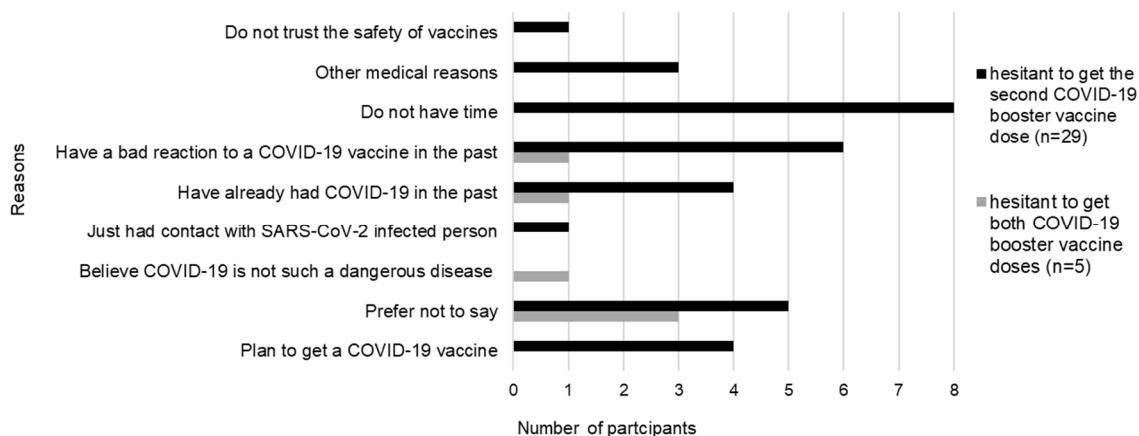


Figure 2. The reasons behind the hesitancy to receive the second (n = 29) or both (n = 5) COVID-19 booster vaccine doses among healthcare workers. Participants could report more than one reason.

Concerns expressed by two participants who did not get any booster dose were based on their personal perceptions of the COVID-19 vaccine and disease prevention. They reported negative experiences with past COVID-19 vaccination and stated that the natural immunity developed after SARS-CoV-2 infection could protect them against COVID-19, which, overall, does not pose serious health risks.

Responses from HCWs who received only one COVID-19 booster dose can be categorised into two themes: (i) influences arising from personal perceptions of the COVID-19 vaccine and disease prevention and (ii) issues directly related to vaccination and its safety. Six individuals reported negative adverse effects after past COVID-19 vaccinations. Some believed in the protective effect of previous exposure to SARS-CoV-2, either as a result of infection or direct contact with a SARS-CoV-2-infected person. However, the majority of participants stated that they did not have time to comply with the recommended vaccination schedule. Four HCWs expressed concerns about safety issues, three interviewees mentioned other medical reasons, and one person distrusted vaccine safety in general.

4. Discussion

Studies on waning humoral immunity after COVID-19 vaccination showed a reduction in anti-SARS-CoV-2 S Ab levels within seven months of completion of the COVID-19 primary vaccination course, ranging from 72% to 95%. Importantly, Ab levels were higher in previously infected HCWs [12,14]. The first booster dose was demonstrated to significantly increase Ab levels (even up to almost 110%) [15], as well as bolster protection against SARS-CoV-2 infection [16–20]. However, the waning effectiveness of the first booster dose within a few months of administration was reported by Patalon et al. [16]. The second booster dose provided a further increase in anti-SARS-CoV-2 S Ab levels. It is noteworthy that peak responses after the second booster dose were similar to, and possibly better than, peak responses after the first booster dose [21]. In addition, immunity waned more quickly after the second booster than after the first booster dose [21]. Several studies from Israel have demonstrated that the second booster dose increases protection against SARS-CoV-2 infection compared to the first booster dose [19,22]. However, similar protective effects for both the first and second booster doses were observed in patients with cancer in Singapore [23]. Our study showed that the anti-SARS-CoV-2 S Ab in HCWs vaccinated with one booster dose were still detectable and no new SARS-CoV-2 infection occurred

ten months after booster vaccination. However, the Ab level was significantly lower than among HCWs with two booster shots. The question that should be answered, but will remain open, is what level of anti-SARS-CoV-2 is effective against severe COVID-19? Only further research may confirm the importance of booster vaccination in the fight against emerging coronaviruses.

One of the main goals of this study was to determine the COVID-19 vaccine booster acceptance among HCWs in Poland. Receipt of at least one booster dose was reported by 92.8% HCWs in October 2022, with more than two in five (42%) HCWs hesitant to receive the second booster dose. Research on the representative Polish population conducted at the same time by Sobierajski et al. revealed that half of the respondents (50.6%) received at least one booster dose [24]. Although it differs from the ECDC data from October 2022, according to which the uptake of the first booster in Poland was 39.2%, [25], the evidence we found points to around two times higher acceptance of COVID-19 vaccine booster doses among HCWs than non-HCWs. The observed trend was also reported globally in June 2022 by Lazarus et al. (19.9% vs. 40.3%, respectively) [26].

Likewise, studies carried out in the USA in 2022 demonstrated a higher uptake of the COVID-19 vaccine booster among HCWs than non-HCWs, but the difference between them was smaller. The acceptance rate reported by Agaku et al. in January 2022 among adults working in hospitals was 60.5%, compared to 48.5% among the general population [27]. In March 2022, Lu et al. found that COVID-19 booster dose coverage was 67.4% among essential healthcare personnel, which was comparable to 63.4% among the general population [28]. Similarly, as reported by Farah et al. in April 2022, more than two-thirds of HCWs (64.8%) received a COVID-19 booster vaccination [29]. High levels of acceptance of at least one booster dose among HCWs were also observed in November 2021 in Czechia (71.3%) [30] and in Singapore in December (73.8%) [31]. Strikingly different from previous results reported in the literature are data from Albania, where in June 2022 only 19.1% of HCWs had received a booster dose [32]. These worldwide differences in acceptance of COVID-19 booster doses among HCWs may be a result of country-specific COVID-19 booster vaccine availability and policies, as well as the current epidemiological situation. However, as HCWs are prioritised for COVID-19 booster vaccination in many countries, understanding the problem of vaccine hesitancy is crucial to combat the COVID-19 pandemic and was addressed in our study.

We found that even in the same healthcare unit, COVID-19 booster vaccination hesitancy differed among occupation groups of HCWs. The lower hesitancy among physicians, nurses, and midwives than for non-health professionals reported in our research is consistent with that of other studies [29,32]. Furthermore, the highest COVID-19 vaccine booster uptake among physicians compared to other HCWs also supports previous findings [29,32]. Tendencies in occupational groups of HCWs toward hesitancy to the first dose booster dose continued for the second booster dose. Moreover, the decreasing level of second booster uptake observed in our study is in line with the analysis of vaccination trends in Poland until January 2023 by Walkowiak et al. [33]. At the beginning of the Omicron VOC wave, the huge majority of HCWs showed a dramatic change in their attitude toward vaccination, including the resignation of the second booster dose uptake, whereas the decision-making of accepting was influenced by social impact, infection trends, as well as the availability of updated booster doses [33]. In addition, our results are consistent with those of Galanis et al., who found that around a third of the nurses in Greece were hesitant about the second booster dose. Increased vaccine hesitancy was associated with uncertainty about updated boosters and COVID-19 vaccination in general, and interestingly, with greater compliance with hygiene measures [34]. The latter reason, which was not mentioned by nurses in our present study, concurs well with our previous finding. In the pre-COVID-19 vaccination era HCWs from the surveyed unit effectively complied with non-pharmaceutical interventions, which resulted in a lower seroprevalence than in low-infection risk unit [12]. Since some HCWs preferred not to admit what influenced their vaccine hesitancy, it can be assumed that some of them fell into complacency, which may be supported by their surviving a

SARS-CoV-2 infection. To sum up, it seems that the working environment has an uneven impact on COVID-19 vaccine behaviour among HCWs from different occupational groups, and other factors influencing vaccine hesitancy need to be taken into account. With respect to other personal motives underlying vaccine hesitancy, we found that previous SARS-CoV-2 infection and negative experiences following COVID-19 vaccination were reasons for hesitancy among those who had not received the second booster dose or either booster dose. Hesitancy among HCWs due to the fear of side effects after booster vaccination was also reported by Dziejczak et al. [35]. In addition, hesitancy about any booster dose arose from the belief that COVID-19 is low risk, which is surprising given that the participants worked in an infectious disease unit. Reluctance to receive the second booster dose was mostly associated with a lack of time.

Despite the proven safety of the mRNA vaccines given as a second booster dose [15,21], safety concerns also prevented HCWs from getting vaccinated. Misinformation not only about the COVID-19 vaccine but also about other vaccines in general undermine vaccine confidence and should be addressed by the scientific community [36–39].

Overall, our results corroborate the findings on attitudes towards COVID-19 booster vaccination among adult Poles conducted by Rzymyski et al. in September 2021. They established that the main reasons for vaccine hesitancy were side effects experienced after previous doses, the opinion that further vaccination was unnecessary, and safety issues [40]. It should be noted that people often do not fully express their fears regarding COVID-19 booster vaccination and in our study, we also found HCWs who did not want to comment on their unwillingness to receive a booster dose. Importantly, as highlighted by Sobierajski et al., public declarations may not align with vaccine behaviour, especially among moderate vaccine supporters/opponents, and should be interpreted with caution [24]. For example, the declared willingness to receive a COVID-19 booster dose in Poland was 71% in September 2021 [40] and 84.2% in July 2022 [26], while according to ECDC data, the uptake of the first booster in Poland in July 2023 was 39.3% [25].

Notwithstanding the relatively small sample, this work offers valuable insights into COVID-19 booster uptake and hesitancy among HCWs in Poland. As being prioritised for booster vaccination does not appear to be a sufficient incentive, close attention should be paid to misinformation in the media, which may shape the COVID-19 vaccine beliefs and behaviour of HCWs as well as the general population. Further research on anti-SARS-CoV-2 S Ab levels following additional booster dose vaccinations would be of great help towards revising vaccination policies to control the outbreak of future waves of COVID-19.

5. Conclusions

Vaccination is the best method to prevent infectious diseases. However, due to many factors, such as anti-vaccination activism, fake news, and the lack of a clear and easy to follow vaccination campaign, many in society are reluctant to receive booster doses of COVID-19 vaccines. Healthcare workers are at the highest risk of SARS-CoV-2 infection, and thus should be well-educated and understand the importance of vaccine booster doses for the control and prevention of COVID-19. We found that almost all HCWs from the high SARS-CoV-2 infection risk unit were vaccinated with a first BNT162b2 booster dose, but more than two in five were hesitant to receive the second booster dose. The presence of the anti-SARS-CoV-2 antibodies, previous negative experiences with vaccination, beliefs about the protective effect of prior infections, and a lack of time were the most common barriers to booster uptake reported by HCWs. Our study shows that information about the effectiveness and safety of the updated COVID-19 vaccines should be widely campaigned among HCW, who may not be keeping updated regarding new knowledge and evidence about benefits of the vaccines in the face of rapidly evolving VOC. We believe that our findings will serve as a basis for policy-makers to increase the booster vaccination coverage not only among HCWs, but also the general population.

Author Contributions: Conceptualization, L.H., M.F. and P.Z.; methodology, P.Z.; investigation, D.L. and R.N.; writing—original draft preparation, D.L. and P.Z.; writing—review and editing, D.L. and P.Z.; supervision, L.H. and P.Z.; funding acquisition, P.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the statutory funds of the Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Resolution No. 470/20, 17 June 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Pollard, A.J.; Bijker, E.M. A Guide to Vaccinology: From Basic Principles to New Developments. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 83–100. [CrossRef]
2. Chitnis, A.S.; Wong, R.J. Review of Updated Hepatitis B Vaccine Recommendations and Potential Challenges with Implementation. *Gastroenterol. Hepatol. (NY)* **2022**, *18*, 447–451.
3. CDC. CDC Works 24/7. Available online: <https://www.cdc.gov/index.htm> (accessed on 22 February 2024).
4. Watson, O.J.; Barnsley, G.; Toor, J.; Hogan, A.B.; Winskill, P.; Ghani, A.C. Global Impact of the First Year of COVID-19 Vaccination: A Mathematical Modelling Study. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 1293–1302. [CrossRef] [PubMed]
5. World Health Organization (WHO). Available online: <https://www.who.int> (accessed on 10 December 2023).
6. OECD; Union, E. *Vaccination against Influenza among People Aged 65 and Over*; OECD: Paris, France, 2020.
7. Spruijt, I.T.; de Lange, M.M.A.; Dijkstra, F.; Donker, G.A.; van der Hoek, W. Long-Term Correlation between Influenza Vaccination Coverage and Incidence of Influenza-like Illness in 14 European Countries. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163508. [CrossRef]
8. Chen, C.; Liu, X.; Yan, D.; Zhou, Y.; Ding, C.; Chen, L.; Lan, L.; Huang, C.; Jiang, D.; Zhang, X.; et al. Global Influenza Vaccination Rates and Factors Associated with Influenza Vaccination. *Int. J. Infect. Dis.* **2022**, *125*, 153–163. [CrossRef]
9. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny. Available online: <https://www.pzh.gov.pl/> (accessed on 16 April 2024).
10. EMA ECDC and EMA Update Recommendations on Additional Booster Doses of mRNA COVID-19 Vaccines. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ecdc-ema-update-recommendations-additional-booster-doses-mrna-covid-19-vaccines> (accessed on 21 November 2022).
11. Yang, Y.; Yang, M.; Peng, Y.; Liang, Y.; Wei, J.; Xing, L.; Guo, L.; Li, X.; Li, J.; Wang, J.; et al. Longitudinal Analysis of Antibody Dynamics in COVID-19 Convalescents Reveals Neutralizing Responses up to 16 Months after Infection. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 423–433. [CrossRef] [PubMed]
12. Lorent, D.; Nowak, R.; Luwański, D.; Pisarska-Krawczyk, M.; Figlerowicz, M.; Zmora, P. The Longitudinal Analysis on the Anti-SARS-CoV-2 Antibodies among Healthcare Workers in Poland—Before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 Vaccination. *Vaccines* **2022**, *10*, 1576. [CrossRef] [PubMed]
13. CoVariants. Available online: <https://covariants.org/> (accessed on 16 April 2024).
14. Stellini, R.; Gianello, R.; Gomasasca, W. Durability of Anti-Spike Antibodies after Vaccination with mRNA SARS-CoV-2 Vaccine Is Longer in Subjects with Previous Infection: Could the Booster Dose Be Delayed? *Infection* **2022**, *50*, 1573–1577. [CrossRef] [PubMed]
15. Yechezkel, M.; Mofaz, M.; Painsky, A.; Patalon, T.; Gazit, S.; Shmueli, E.; Yamin, D. Safety of the Fourth COVID-19 BNT162b2 mRNA (Second Booster) Vaccine: A Prospective and Retrospective Cohort Study. *Lancet Respir. Med.* **2023**, *11*, 139–150. [CrossRef]
16. Patalon, T.; Gazit, S.; Pitzer, V.E.; Prunas, O.; Warren, J.L.; Weinberger, D.M. Odds of Testing Positive for SARS-CoV-2 Following Receipt of 3 vs. 2 Doses of the BNT162b2 mRNA Vaccine. *JAMA Intern. Med.* **2022**, *182*, 179–184. [CrossRef]
17. Barda, N.; Dagan, N.; Cohen, C.; Hernán, M.A.; Lipsitch, M.; Kohane, I.S.; Reis, B.Y.; Balicer, R.D. Effectiveness of a Third Dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine for Preventing Severe Outcomes in Israel: An Observational Study. *Lancet* **2021**, *398*, 2093–2100. [CrossRef]
18. Saciuk, Y.; Kertes, J.; Shamir Stein, N.; Ekka Zohar, A. Effectiveness of a Third Dose of BNT162b2 mRNA Vaccine. *J. Infect. Dis.* **2022**, *225*, 30–33. [CrossRef]
19. Bar-On, Y.M.; Goldberg, Y.; Mandel, M.; Bodenheimer, O.; Freedman, L.; Kalkstein, N.; Mizrahi, B.; Alroy-Preis, S.; Ash, N.; Milo, R.; et al. Protection of BNT162b2 Vaccine Booster against Covid-19 in Israel. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1393–1400. [CrossRef]
20. Moreira, E.D.; Kitchin, N.; Xu, X.; Dychter, S.S.; Lockhart, S.; Gurtman, A.; Perez, J.L.; Zerbini, C.; Dever, M.E.; Jennings, T.W.; et al. Safety and Efficacy of a Third Dose of BNT162b2 Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1910–1921. [CrossRef]

21. Munro, A.P.S.; Feng, S.; Janani, L.; Cornelius, V.; Aley, P.K.; Babbage, G.; Baxter, D.; Bula, M.; Cathie, K.; Chatterjee, K.; et al. Safety, Immunogenicity, and Reactogenicity of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines given as Fourth-Dose Boosters Following Two Doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 and a Third Dose of BNT162b2 (COV-BOOST): A Multicentre, Blinded, Phase 2, Randomised Trial. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 1131–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Magen, O.; Waxman, J.G.; Makov-Assif, M.; Vered, R.; Dicker, D.; Hernán, M.A.; Lipsitch, M.; Reis, B.Y.; Balicer, R.D.; Dagan, N. Fourth Dose of BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1603–1614. [[CrossRef](#)]
23. Tan, W.C.; Tan, J.Y.J.; Lim, J.S.J.; Tan, R.Y.C.; Lee, A.R.Y.B.; Leong, F.L.; Lee, S.C.; Chai, L.Y.A.; Tan, T.T.; Malek, M.I.B.A.; et al. COVID-19 Severity and Waning Immunity After up to 4 mRNA Vaccine Doses in 73,608 Patients with Cancer and 621,475 Matched Controls in Singapore: A Nationwide Cohort Study. *JAMA Oncol.* **2023**, *9*, 1221–1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sobierajski, T.; Rzymyski, P.; Wanke-Rytt, M. Impact of the COVID-19 Pandemic on Attitudes toward Vaccination: Representative Study of Polish Society. *Vaccines* **2023**, *11*, 1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. COVID-19 Vaccine Tracker | European Centre for Disease Prevention and Control. Available online: <https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#uptake-tab> (accessed on 22 February 2024).
26. Lazarus, J.V.; Wyka, K.; White, T.M.; Picchio, C.A.; Gostin, L.O.; Larson, H.J.; Rabin, K.; Ratzan, S.C.; Kamarulzaman, A.; El-Mohandes, A. A Survey of COVID-19 Vaccine Acceptance across 23 Countries in 2022. *Nat. Med.* **2023**, *29*, 366–375. [[CrossRef](#)]
27. Agaku, I.T.; Adeoye, C.; Long, T.G. Geographic, Occupational, and Sociodemographic Variations in Uptake of COVID-19 Booster Doses Among Fully Vaccinated US Adults, December 1, 2021, to January 10, 2022. *JAMA Netw. Open* **2022**, *5*, e2227680. [[CrossRef](#)]
28. Lu, P.; Srivastav, A.; Vashist, K.; Black, C.L.; Kriss, J.L.; Hung, M.-C.; Meng, L.; Zhou, T.; Yankey, D.; Masters, N.B.; et al. COVID-19 Booster Dose Vaccination Coverage and Factors Associated with Booster Vaccination among Adults, United States, March 2022. *Emerg. Infect. Dis.* **2023**, *29*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Farah, W.; Breeher, L.E.; Hainy, C.M.; Tommaso, C.P.; Swift, M.D. Who Is Getting Boosted? Disparities in COVID-19 Vaccine Booster Uptake among Health Care Workers. *Vaccine X* **2023**, *13*, 100269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Klugar, M.; Riad, A.; Mohanan, L.; Pokorná, A. COVID-19 Vaccine Booster Hesitancy (VBH) of Healthcare Workers in Czechia: National Cross-Sectional Study. *Vaccines* **2021**, *9*, 1437. [[CrossRef](#)]
31. Koh, S.W.C.; Tan, H.M.; Lee, W.H.; Mathews, J.; Young, D. COVID-19 Vaccine Booster Hesitancy among Healthcare Workers: A Retrospective Observational Study in Singapore. *Vaccines* **2022**, *10*, 464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jorgensen, P.; Schmid, A.; Sulo, J.; Preza, I.; Hasibra, I.; Kissling, E.; Fico, A.; Sridhar, S.; Rubin-Smith, J.E.; Kota, M.; et al. Factors Associated with Receipt of COVID-19 Vaccination and SARS-CoV-2 Seropositivity among Healthcare Workers in Albania (February 2021–June 2022): Secondary Analysis of a Prospective Cohort Study. *Lancet Reg. Health—Eur.* **2023**, *27*, 100584. [[CrossRef](#)]
33. Walkowiak, M.P.; Domaradzki, J.; Walkowiak, D. Are We Facing a Tsunami of Vaccine Hesitancy or Outdated Pandemic Policy in Times of Omicron? Analyzing Changes of COVID-19 Vaccination Trends in Poland. *Vaccines* **2023**, *11*, 1065. [[CrossRef](#)]
34. Galanis, P.; Vraika, I.; Katsiroumpa, A.; Siskou, O.; Konstantakopoulou, O.; Katsoulas, T.; Mariolis-Sapsakos, T.; Kaitelidou, D. Predictors of Second COVID-19 Booster Dose or New COVID-19 Vaccine Hesitancy among Nurses: A Cross-sectional Study. *J. Clin. Nurs.* **2023**, *32*, 3943–3953. [[CrossRef](#)]
35. Dzedzic, A.; Issa, J.; Hussain, S.; Tanasiewicz, M.; Wojtyczka, R.; Kubina, R.; Konwinska, M.D.; Riad, A. COVID-19 Vaccine Booster Hesitancy (VBH) of Healthcare Professionals and Students in Poland: Cross-Sectional Survey-Based Study. *Front. Public Health* **2022**, *10*, 938067. [[CrossRef](#)]
36. Hoffman, B.L.; Felter, E.M.; Chu, K.-H.; Shensa, A.; Hermann, C.; Wolynn, T.; Williams, D.; Primack, B.A. It's Not All about Autism: The Emerging Landscape of Anti-Vaccination Sentiment on Facebook. *Vaccine* **2019**, *37*, 2216–2223. [[CrossRef](#)]
37. Lee, S.K.; Sun, J.; Jang, S.; Connelly, S. Misinformation of COVID-19 Vaccines and Vaccine Hesitancy. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 13681. [[CrossRef](#)]
38. Romer, D.; Winneg, K.M.; Jamieson, P.E.; Brensinger, C.; Jamieson, K.H. Misinformation about Vaccine Safety and Uptake of COVID-19 Vaccines among Adults and 5–11-Year-Olds in the United States. *Vaccine* **2022**, *40*, 6463–6470. [[CrossRef](#)]
39. Carrieri, V.; Guthmuller, S.; Wübker, A. Trust and COVID-19 Vaccine Hesitancy. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 9245. [[CrossRef](#)]
40. Rzymyski, P.; Poniedziałek, B.; Fal, A. Willingness to Receive the Booster COVID-19 Vaccine Dose in Poland. *Vaccines* **2021**, *9*, 1286. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.