

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL MEDICINĂ**

**EXPLORAREA RĂSPUNSULUI IMUN**

**ÎN INFECȚIA CU SARS-CoV-2**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. HRISTEA ADRIANA**

**Student-doctorand:**

**NEDELICU IULIA-MARIA**

**2025**

## Cuprins

|   |    |
|---|----|
| Introducere.....  | 4  |
| Contribuții personale .....   | 5  |
| 1. Scopul și obiectivele generale.....  | 5  |
| 2. Materiale și metode pentru studiile 1 și 2 .....   | 6  |
| 3. Evaluarea anticorpilor anti SARS-CoV-2 prin metode disponibile comercial.....  | 6  |
| 3.1. Obiectiv 1: Evaluarea performanței clinice și concordanța dintre șase teste serologice disponibile comercial folosind tehnologii diferite: CMIA, ELISA, CLIA și ECLIA .....  | 6  |
| 3.1.1. Introducere .....  | 6  |
| 3.1.2. Rezultate.....   | 7  |
| 3.1.3. Discuții .....   | 7  |
| 3.1.4. Concluzii .....  | 8  |
| 3.2. Obiectiv 2: Analizare seroconversiei și dinamica anticorpilor ca răspuns la infecția cu SARS-CoV-2 .....   | 8  |
| 3.2.1. Introducere .....  | 8  |
| 3.2.2. Rezultate.....   | 8  |
| 3.2.3. Discuții .....   | 9  |
| 3.2.4. Concluzii .....  | 10 |
| 4. Analiză longitudinală a capacității de neutralizare a anticorpilor anti-SARS-CoV-2 împotriva variantei Delta și corelarea acestora cu o metoda comercială de determinare cantitativă a anticorpilor anti-s1/s2 IgG (DiaSorin).....   | 11 |
| 4.1. Obiectiv 3: Dezvoltarea unei variante a tehnicii de neutralizare, folosind un marker surogat ( receptor pentru angiotensin convertaza 2) și corelarea acesteia cu una din tehnicile evaluate, CLIA IgG (DiaSorin), metodă cantitativă pentru detecția de anticorpi anti S..... | 11 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.1.1. | Introducere .....   | 11 |
| 4.1.2. | Rezultate.....  | 11 |
| 4.1.3. | Discuții .....  | 12 |
| 4.1.5. | Concluzii .....   | 12 |
| 4.2.   | Obiectiv 4: Studierea capacității de neutralizare a anticorpilor anti SARS-CoV-2 din perioada inițială a pandemiei COVID 19 (tulpina wild-type) în raport cu variantele virale ulterioare (Delta) ..... | 13 |
| 4.2.1. | Introducere .....   | 13 |
| 4.2.2. | Rezultate.....  | 13 |
| 4.2.3. | Discuții .....  | 14 |
| 4.2.4. | Concluzii .....   | 14 |
| 5.     | Evaluarea factorilor de risc asociați cu long COVID (Obiectiv 5).....   | 14 |
| 5.1.   | Introducere.....  | 14 |
| 5.2.   | Materiale și metode utilizate pentru studiul 3 .....  | 15 |
| 5.3.   | Rezultatele studiului 3 .....   | 15 |
| 5.4.   | Discuții referitoare la studiul 3 .....   | 15 |
| 5.5.   | Concluziile studiului 3.....  | 16 |
|        | Bibliografie selectivă.....   | 17 |

## Introducere

Pandemia COVID-19, cauzată de coronavirusul sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2), a generat o criză globală de sănătate publică și a avut un impact profund asupra economiei, societății și politicii la nivel mondial, iar înțelegerea răspunsului imun la infecția cu SARS-CoV-2 a devenit esențială pentru dezvoltarea unor soluții eficiente de diagnostic, prevenție și tratament.

Noutatea și actualitatea cercetării sunt susținute de evoluția continuă a pandemiei și de emergența unor noi variante virale, precum și de schimbările rapide în practica medicală și în politicile de sănătate publică

Cercetările abordate în cadrul acestei teze fac parte din eforturile globale de combatere a pandemiei COVID-19. Încadrarea temei în preocupările internaționale, naționale și regionale se reflectă în implicarea activă a numeroase echipe de cercetători din întreaga lume în investigarea răspunsului imun în infecția cu SARS-CoV-2 pentru a descoperi mecanisme patogenice și a dezvolta terapii și vaccinuri eficiente. Echipa noastră de cercetare împreună cu colaboratori locali contribuie la eforturile comune de a înțelege și combate această boală devastatoare.

Ipoteza centrală a acestei teze constă în faptul că răspunsul imun la infecția cu SARS-CoV-2 variază semnificativ în funcție de factori genetici și demografici, influențând severitatea bolii și eficacitatea tratamentelor.

Obiectivele științifice abordate în cadrul acestei teze sunt diverse și includ evaluarea performanței diferitelor teste serologice disponibile comercial, analiza seroconversiei și dinamica anticorpilor în răspunsul la infecția cu SARS-CoV-2, precum și evaluarea capacității de neutralizare a anticorpilor împotriva unor variante virale specifice. În plus, aceasta cuprinde și investigarea factorilor de risc asociați cu Long COVID, completând astfel un tablou comprehensiv al răspunsului imun și al evoluției bolii în contextul pandemiei COVID-19.

Această cercetare interdisciplinară, combină domenii precum imunologia, biologia moleculară, genetica și practica clinică. Colaborarea dintre experți din aceste domenii a permis o abordare holistică a problemelor complexe legate de răspunsul imun la SARS-CoV-2.

# Contribuții personale

## 1. Scopul și obiectivele generale

Această teză urmărește să aprofundeze înțelegerea răspunsului imun în infecția cu SARS-CoV-2 prin evaluarea testelor serologice, analiza dinamicii și capacității anticorpilor de a neutraliza variantele virale, și studierea factorilor ce influențează evoluția bolii, inclusiv Long COVID.

Sumarizarea celor trei studii desfășurate în cadrul cercetării doctorale, împreună cu obiectivele formulate în cadrul acestora se regăsește în Figura 1.

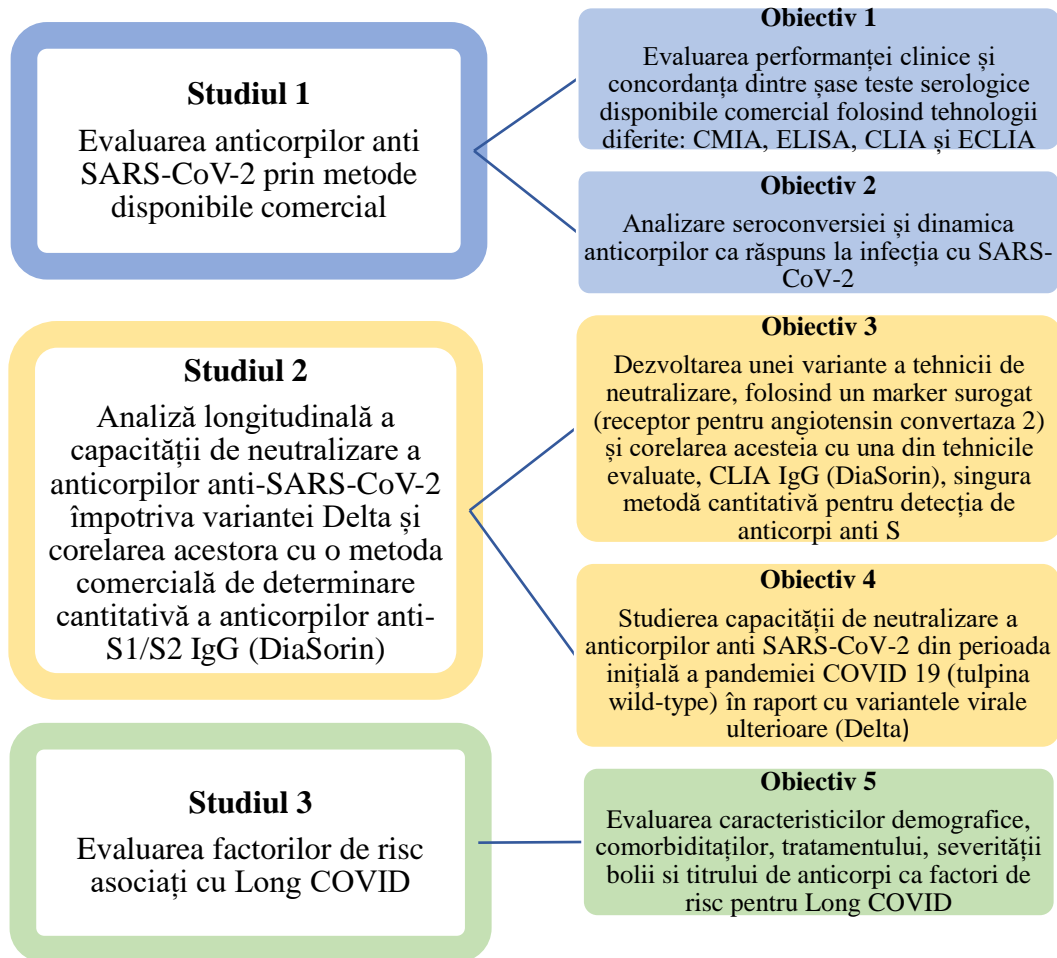


Figura 1. Planul pentru studiile de cercetare doctorală

## **2. Materiale și metode pentru studiile 1 și 2**

Primul studiu a fost unul prospectiv multicentric realizat în două spitale din București, România și a urmărit răspunsul serologic la infecția cu SARS-CoV-2. Înrolarea pacienților a avut loc între mai și octombrie 2020, incluzând 156 de pacienți cu forme diferite de boală, pentru care s-au colectat probe seriate de ser pentru analiza dinamicii anticorpilor. Au fost utilizate șase testele serologice disponibile comercial pentru detectarea anticorpilor IgM și IgG: Elecsys® IgM și IgG anti-SARS-CoV-2 (Roche), LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (DiaSorin), SARS-CoV-2 IgG și SARS-CoV-2 IgM (Abbott) și kituri ELISA KT-1032 EDI™ IgG și KT-1033 EDI™ IgM (EpiTop). Analiza statistică a evaluat sensibilitatea și specificitatea acestora, precum și gradul de concordanță dintre cele șase metode serologice.

Cel de-al doilea studiu a inclus pacienți cu forme simptomatice de COVID-19, urmăriți prin prelevarea de probe de ser la 30, 90 și 180 de zile de la debutul simptomelor, excluzând pacienții vaccinați în orice moment pe parcursul studiului. Obiectivul a fost monitorizarea răspunsului de anticorpi specifici și a anticorpilor neutralizanți, utilizând atât un test de chemiluminiscență, cât și un test de pseudoneutralizare. Rezultatele au fost analizate statistic pentru a evalua dinamica anticorpilor și corelațiile între vizite, dar și între cele două metode utilizate.

### **3. Evaluarea anticorpilor anti SARS-CoV-2 prin metode disponibile comercial**

#### **3.1. Obiectiv 1: Evaluarea performanței clinice și concordanța dintre șase teste serologice disponibile comercial folosind tehnologii diferite: CMIA, ELISA, CLIA și ECLIA**

##### **3.1.1. Introducere**

Odată cu evoluția pandemiei COVID-19, cercetările asupra răspunsului imun în infecția cu SARS-CoV-2 au progresat semnificativ (1), dar imunitatea rămâne incomplet elucidată, iar multitudinea testelor serologice disponibile, bazate pe tehnologii diverse (ELISA, CMIA, CLIA, ECLIA, LFIA și Imunoblot Multiplex), evidențiază necesitatea evaluării performanței clinice a acestor metode, ținând cont de variabilitatea antigenelor virale vizate, anticorpii detectați (IgM,

IgG sau ambii), severitatea bolii și potențialele probleme de reactivitate încrucișată, pentru a asigura validarea independentă înainte de utilizarea lor pe scară largă în practica clinică (2).

### **3.1.2. Rezultate**

Grupul de studiu COVID-19 a inclus 156 de pacienți, majoritar bărbați, cu vârsta mediană de 50,5 ani. Probele serologice au fost colectate la intervale variabile de la debutul simptomelor, cu o mediană de timp de la debutul simptomelor până la recoltare de 16 zile. Hipertensiunea arterială, diabetul și obezitatea au fost cele mai comune comorbidități. În ceea ce privește severitatea bolii, 39,7% dintre pacienți au avut forme ușoare, 33,9% forme moderate, iar 26,2% forme severe. Sensibilitatea și specificitatea testelor de anticorpi IgG și IgM au variat în funcție de metodă și momentul recoltării. Rata seropozitivității IgG a crescut treptat și s-a menținut la peste 95% pentru anumite teste (CLIA și ECLIA) după trei luni de la debutul simptomelor, deși alte teste (CMIA și ELISA) au arătat o ușoară scădere a ratei de pozitivitate în timp. Concordanța între testele IgG antiN a fost ridicată (până la 78%), dar scăzută pentru testele de IgM (19%).

### **3.1.3. Discuții**

În comparație cu alte studii, cercetarea mea a evidențiat diferențe între testele serologice comerciale în funcție de momentul debutului simptomelor, cu IgG persistând mai mult decât IgM, care a scăzut după patru săptămâni, în timp ce sensibilitatea combinată a IgM și IgG a fost mai eficientă decât detectarea izolată a acestor anticorpi. De exemplu, sensibilitatea ELISA IgG la trei săptămâni de la debutul simptomelor a fost similară cu rezultatele lui Whitman, dar sensibilitatea ELISA IgM în cercetarea mea a fost mai mică (3). Sensibilitatea mai scăzută pentru probele din studiul meu, în special la >15 zile, se explică prin titrul scăzut de anticorpi, frecvent întâlnit la pacienți cu forme ușoare sau asimptomatice, care predomină în eșantionul analizat.

Testele CMIA IgG antiN (Abbott), CLIA IgG antiS1/S2 (DiaSorin) și ECLIA total antiN (Roche) au avut performanțe comparabile cu cele raportate în alte studii, dar sensibilitatea globală a fost influențată de procentul ridicat de pacienți cu forme ușoare (4). Evaluările pe termen lung arată că anticorpii antiN și antiS persistă cel puțin șase luni (5), testul ECLIA total

antiN având o sensibilitate și specificitate ridicate pentru seroprevalență. În concluzie, performanțele testelor variază în funcție de severitatea bolii și de momentul recoltării probelor, subliniind necesitatea de a evalua mai multe teste pe eșantioane diverse înainte de utilizarea în practica clinică.

#### **3.1.4. Concluzii**

Testele serologice evaluate demonstrează o specificitate ridicată, însă sensibilitatea lor variază în funcție de momentul debutului simptomelor, severitatea bolii, metoda și antigenul folosit. De aceea, interpretarea rezultatelor serologice trebuie realizată cu precauție și ținând cont de tabloul clinic. Combinarea testării pentru anticorpii IgM și IgG ar putea îmbunătăți performanța testelor, în special pentru infecții acute și pentru cazurile cu prezentare tardivă, simptome atipice sau prelungite, unde RT-PCR poate avea rezultate negative.

### **3.2. Obiectiv 2: Analizare seroconversiei și dinamica anticorpilor ca răspuns la infecția cu SARS-CoV-2**

#### **3.2.1 Introducere**

Seroconversia apare, în general, între 10 și 21 de zile după debutul infecției, dar acest interval poate varia în funcție de severitatea bolii și de răspunsul imun individual (6). La pacienții cu forme ușoare, seroconversia poate fi întârziată sau chiar absentă, în timp ce formele severe de COVID-19 sunt asociate cu un răspuns imun mai intens și mai durabil (7). Acest studiu a analizat dinamica seroconversiei și evoluția concentrațiilor de anticorpi folosind diverse metode serologice, subliniind importanța acestor date pentru înțelegerea imunității pe termen lung și pentru optimizarea strategiilor de diagnostic și tratament.

#### **3.2.2. Rezultate**

Studiul a inclus 156 de pacienți, majoritatea bărbați (59,6%) cu vârsta mediană de 50,5 ani. Dintre aceștia, 39,7% au avut forme ușoare, 33,9% moderate și 26,2% severe de COVID-19. Rata de seroconversie și detecția anticorpilor au variat între testele serologice, cu CLIA IgG antiS1/S2 și CMIA IgG antiN prezentând cele mai ridicate rate de seroconversie (79,6%-

87,5%), spre deosebire de ELISA IgM antiN, care a avut o rată de 54,6%. Seroconversia a apărut în medie între 10 și 13 zile de la debutul simptomelor, cu diferențe în funcție de severitatea bolii.

Analiza dinamicii anticorpilor a arătat că aceștia sunt detectați mai devreme la pacienții cu forme severe și moderate. După 90 de zile, pacienții cu forme severe au avut rate de seropozitivare mai mari. De asemenea, concentrațiile de anticorpi IgG au fost semnificativ mai mari la pacienții cu forme severe (202 AU/mL) comparativ cu cei cu forme moderate și ușoare după trei luni.

### 3.2.3. Discuții

Un aspect important observat a fost dinamica apariției anticorpilor IgM și IgG. În cele mai multe cazuri, aceștia au fost detectați simultan, dar aproximativ o treime dintre pacienți au prezentat anticorpi IgM mai devreme decât IgG. Testarea anticorpilor IgM prin metoda CMIA (Abbott) a arătat o rată de pozitivare mai mare în primele zile de la debutul simptomelor (<5 zile: 23%) și o sensibilitate de 96% la trei săptămâni, menținându-se superioară altor metode precum ELISA. Totuși, anticorpii IgG au avut o seroconversie mediană de 11-13 zile, similară cu rezultatele altor studii (8).

În privința metodelor de testare, performanțele au variat în funcție de antigenul țintă. Testele orientate către detectarea proteinei N au avut o detecție mai rapidă și mai sensibilă decât cele care vizau proteina S1/S2 (9). Diferențele între metode, precum CMIA, ELISA și CLIA, pot fi atribuite naturii antigenelor țintă, structurii acestora și valorilor de cutoff utilizate. De exemplu, anticorpii IgG detectați prin metode cantitative, precum CLIA, au permis evaluări detaliate ale concentrațiilor și dinamica răspunsului imun.

Un alt factor determinant al răspunsului imun a fost severitatea bolii. Pacienții cu forme severe de COVID-19 au prezentat niveluri mai ridicate de anticorpi, dar și o seroconversie mai rapidă comparativ cu cei cu forme moderate sau ușoare (10). După 90 de zile de la debutul simptomelor, ratele de seropozitivare au fost semnificativ mai mari la pacienții cu forme severe, ceea ce indică o persistență mai îndelungată a anticorpilor. În plus, măsurarea cantitativă a anticorpilor a arătat că pacienții cu forme severe au înregistrat valori medii semnificativ mai mari decât cei cu forme ușoare sau moderate. Acest răspuns imun robust poate fi legat de încărcătura virală mai mare și de inflamația sistemică severă, care stimulează puternic sistemul imunitar. De asemenea, variabilitatea răspunsului imun în funcție de severitatea bolii ridică

întrebări importante legate de protecția pe termen lung împotriva reinfecției. Pacienții cu forme ușoare, având niveluri mai scăzute de anticorpi, ar putea fi mai vulnerabili la reinfectare, în timp ce cei cu forme severe ar putea beneficia de o protecție mai îndelungată, deși durabilitatea acestui răspuns rămâne de evaluat.

#### **3.2.4. Concluzii**

Studiul arată că majoritatea pacienților dezvoltă anticorpi anti-SARS-CoV-2, iar frecvența și dinamica seroconversiei depind de momentul recoltării și de metodele de testare. Anticorpii IgG au fost mai frecvent detectați decât IgM, în special prin ELISA, dar testul CMIA (Abbott) a arătat o rată mai mare de pozitivare a IgM în primele zile (83,8% în primele 10 zile și 96% după trei săptămâni). Seroconversia simultană a IgM și IgG a fost frecventă, iar în o treime dintre pacienți, IgM au apărut înaintea IgG.

Testele bazate pe detectarea proteinei N au avut o sensibilitate mai mare decât cele bazate pe proteina S, indicând importanța alegerii corecte a metodei pentru diagnosticul precoce. Performanța testelor variază în funcție de severitatea bolii și timpul de la debut, testele ELISA fiind mai sensibile la diferențele dintre formele ușoare și severe.

Diferențele în titrul de anticorpi între formele ușoare și severe subliniază importanța monitorizării post-COVID și riscurile de reinfecție. Măsurările cantitative, precum CLIA IgG anti-S1/S2, sunt esențiale pentru evaluarea răspunsului imun și ghidarea tratamentului pe termen lung, inclusiv necesitatea de doze de rapel pentru pacienții cu forme ușoare.

#### **4. Analiză longitudinală a capacității de neutralizare a anticorpilor anti-SARS-CoV-2 împotriva variantei Delta și corelarea acestora cu o metoda comercială de determinare cantitativă a anticorpilor anti-S1/S2 IgG (DiaSorin)**

##### **4.1. Obiectiv 3: Dezvoltarea unei variante a tehnicii de neutralizare, folosind un marker surogat ( receptor pentru angiotensin convertaza 2) și corelarea acesteia cu una din tehnicile evaluate, CLIA IgG (DiaSorin), metodă cantitativă pentru detecția de anticorpi anti S**

###### **4.1.1. Introducere**

Imunitatea umorală, alături de imunitatea înăscută și răspunsul imun mediat celular, joacă un rol crucial în gestionarea infecției cu SARS-CoV-2. Deși nu se știe dacă anticorpii neutralizanți (NAbs) sunt mecanismul principal de protecție, aceștia previn pătrunderea virusului în celule și sunt esențiali în dezvoltarea imunității pe termen lung, având un rol important în evaluarea eficienței vaccinurilor (11).

Deși tehnicile de detectare moleculară, precum RT-PCR, sunt utile, există o necesitate urgentă de teste serologice fiabile pentru a urmări infecțiile asimptomatice, rata fatalității și imunitatea de grup. În prezent, există teste de anticorpi care detectează NAbs, dar cele mai accesibile, precum ELISA sau teste rapide, nu pot distinge între anticorpi neutralizanți și cei ne-neutralizanți. O provocare este stabilirea dacă aceste teste mai simple pot oferi informații precise despre imunitatea protectoare (12).

Studiul propune compararea unei metode comerciale cantitative pentru evaluarea anticorpilor anti-spike S1/S2 IgG cu o variantă de testare a neutralizării, care folosește un marker surogat pentru a măsura capacitatea anticorpilor de a bloca interacțiunea virusului cu celulele gazdă, pentru a evalua acuratețea și fiabilitatea testelor serologice.

###### **4.1.2. Rezultate**

Studiul a inclus 25 de pacienți, majoritatea tineri și cu simptome ușoare până la moderate. S-au analizat corelațiile dintre NAbs și anticorpii IgG anti-S1/S2, observându-se o corelație mai slabă între NAbs pentru varianta Delta și IgG anti-S1/S2, comparativ cu varianta WT. Inițial, corelația a fost slabă ( $r=0,39$ ), dar a crescut și a rămas la valori constante peste 0.7

la vizitele ulterioare. Corelația între NAbs pentru Delta și WT a fost constant puternică (peste 0.76).

În ceea ce privește neutralizarea încrucișată ( $NT_{50}Delta/NT_{50}WT$ ), s-a observat că un procent semnificativ de pacienți au avut titruri  $NT_{50}$  Delta mai mari decât cele pentru varianta WT, la fiecare dintre cele trei vizite de monitorizare.

### **4.1.3. Discuții**

Testele serologice, precum CLIA IgG anti-S1/S2 (DiaSorin), au arătat o performanță superioară în diagnosticarea imunității post-infecție sau post-vaccinare. Totuși, anticorpilor neutralizanți scad în timp, ceea ce poate duce la discrepanțe între testele serologice și titrurile de neutralizare.

Conform datelor prezentate, răspunsul imun umoral poate varia semnificativ, iar testele serologice precum DiaSorin S1/S2 au arătat o dinamică relativ constantă în timp, spre deosebire de titrurile  $NT_{50}$ , care au scăzut progresiv pentru variantele de tip sălbatic și Delta. Interesant, în grupul studiat, un subset notabil (24-28%) de participanți a avut o neutralizare mai eficientă a variantei Delta comparativ cu varianta WT, sugerând o variabilitate individuală în răspunsul imunitar. Aceasta este în concordanță cu alte studii (13, 14) care subliniază necesitatea de a monitoriza în detaliu răspunsurile imunologice pentru a înțelege evoluția acestora.

Corelația slabă observată între  $NT_{50}$  și testul serologic la prima vizită poate fi explicată prin proximitatea momentului colectării probelor față de debutul simptomelor, când răspunsul imun este încă în formare. De asemenea, testele de neutralizare încrucișată oferă informații valoroase pentru ghidarea strategiilor de dezvoltare a vaccinurilor, mai ales în contextul urgenței variantelor virale.

### **4.1.5. Concluzii**

Studiul a evidențiat corelații puternice între titrurile de anticorpi neutralizanți pentru variantele Delta și WT, indicând un răspuns imun similar. Totuși, declinul mai accentuat al anticorpilor pentru varianta Delta sugerează diferențe în eficacitatea răspunsului imun. Anticorpilor anti-S1/2 IgG (DiaSorin) au rămas constanți, dar nu reflectă declinul neutralizării, ceea ce limitează utilitatea lor ca indicator al protecției. De asemenea, stabilitatea indicilor de

neutralizare încrucișată pe termen scurt subliniază limitele testului IgG (DiaSorin) în evaluarea protecției împotriva variantelor virale.

## **4.2. Obiectiv 4: Studiarea capacității de neutralizare a anticorpilor anti SARS-CoV-2 din perioada inițială a pandemiei COVID 19 (tulpina wild-type) în raport cu variantele virale ulterioare (Delta)**

### **4.2.1. Introducere**

Pe măsură ce pandemia a evoluat, au apărut variante îngrijorătoare (VOC) precum Alpha, Beta, Gamma, Delta și Omicron, care au prezentat mutații semnificative ce afectează eficiența NAbs și impactează transmisibilitatea și severitatea bolii. Varianta Delta, în special, a demonstrat o contagiozitate și virulență ridicate, cu o eficiență scăzută a vaccinurilor comparativ cu alte variante. Monitorizarea acestor variante este crucială pentru adaptarea strategiilor de vaccinare și tratament (15).

Studiile longitudinale sunt esențiale pentru a evalua eficacitatea vaccinurilor și răspunsul imun la variantele emergente. În plus, cercetările privind neutralizarea încrucișată ajută la înțelegerea capacității anticorpilor de a combate mai multe variante ale virusului. Obiectivul principal a fost analiza răspunsului imun la tulpina originală (WT) și la variantele ulterioare (Delta), folosind măsurători ale anticorpilor IgG și titrurilor de neutralizare.

### **4.2.2. Rezultate**

Studiul a analizat 25 de participanți, cu o vârstă mediană de 51 de ani, majoritatea fiind femei. Participanții au fost monitorizați pe parcursul a trei vizite, la intervale de 33, 90 și 195 de zile de la debutul simptomelor. Majoritatea au avut forme ușoare și moderate de COVID-19, cu 16% având forme severe. Cele mai frecvente comorbidități au fost hipertensiunea, afecțiunile cardiovasculare și obezitatea.

Seropozitivitatea pentru anticorpii anti-S1/S2 IgG a fost 100% la prima vizită și a scăzut la 96% și 92% la vizitele 2 și 3. În ceea ce privește NAbs, toate probele au prezentat neutralizare pentru varianta WT și Delta la prima vizită, dar procentul de seropozitivitate a scăzut semnificativ la vizitele 2 și 3 (88%-52% pentru WT și 60%-52% pentru Delta). Titlurile NT<sub>50</sub>

au scăzut semnificativ în timp, mai mult pentru varianta Delta (scădere de 80%-84%) comparativ cu varianta WT (scădere de 70%-77%).

### **4.2.3. Discuții**

Mai multe studii au comparat răspunsurile imune induse de vaccinare și infecția naturală cu SARS-CoV-2, evidențiind diferențe în eficacitatea protecției (16). Unele cercetări sugerează că persoanele nevaccinate, dar cu infecție anterioară, au concentrații de anticorpi echivalente sau chiar superioare celor asociate cu protecția de 70%, însă doar o mică parte ating niveluri care ar asigura o protecție de 90% (17). Acest lucru indică faptul că vaccinarea poate ajuta la atingerea unor titruri optime de anticorpi pentru protecție durabilă. În studii longitudinale, ca cel realizat de Muecksch (13) și Moryiama (18), s-a observat o reducere semnificativă a eficienței neutralizării variantei Delta, iar vaccinarea a îmbunătățit semnificativ capacitatea de neutralizare. Cercetări similare, precum cele ale lui Kuzmina și colaboratorilor (19), au arătat o scădere moderată a eficacității neutralizării variantei Delta, dar cu o protecție îmbunătățită după vaccinare.

### **4.2.4. Concluzii**

Studiul subliniază variabilitatea răspunsului imun la infecția cu SARS-CoV-2, influențat de severitatea și durata infecției. Scăderea anticorpilor, mai pronunțată pentru varianta Delta, sugerează că protecția poate varia între variante. Monitorizarea continuă și ajustarea strategiilor de vaccinare și rapel sunt esențiale pentru menținerea protecției.

## **5. Evaluarea factorilor de risc asociați cu long COVID (Obiectiv 5)**

### **5.1. Introducere**

Long COVID, sau sindromul COVID cronic, se referă la o serie de simptome persistente care apar la câteva luni după infecția cu SARS-CoV-2. Deși nu există o definiție unanim acceptată, Organizația Mondială a Sănătății definește long COVID ca simptome persistente care apar la cel puțin trei luni de la infecția inițială și durează minimum două luni. Aproximativ 10-20% dintre persoanele infectate continuă să prezinte simptome pe termen lung, cum ar fi

oboseala extremă, dificultăți respiratorii, probleme cognitive și dureri (20). Factorii de risc pentru long COVID includ vârsta, sexul, comorbiditățile, severitatea infecției și încărcătura virală (21). Cercetările despre legătura dintre titrurile de anticorpi și long COVID sunt contradictorii. Acest studiu a urmărit să exploreze aceste legături și să identifice factorii de risc pentru dezvoltarea simptomelor persistente.

## **5.2. Materiale și metode utilizate pentru studiul 3**

Studiul a inclus adulți diagnosticați cu SARS-CoV-2, confirmați prin RT-PCR, recrutați în mai 2020. Probele de sânge au fost colectate la aproximativ 6 +/- 10 zile, 33 +/- 10 zile (vizita 1) și 91 +/- 19 zile (vizita 2) de la debutul simptomelor sau diagnosticare. Datele au inclus informații demografice, clinice și simptomele persistente, cu aplicarea unui chestionar telefonic pentru pacienții care prezentau încă simptome la a doua vizită pentru long COVID. Long COVID a fost definit ca simptome persistente după 3 luni. Testele serologice pentru anticorpi IgG anti-S1/S2 au analizat răspunsul imun, iar analizele statistice au comparat pacienții cu și fără simptome long COVID.

## **5.3. Rezultatele studiului 3**

Studiul a inclus inițial 93 de pacienți, însă 13 au fost excluși din cauza decesului și pierderii contactului, astfel că analiza finală a fost realizată pe 80 de pacienți, cu o vârstă mediană de 49,5 ani. Dintre aceștia, 44% au fost bărbați, iar 53,75% au prezentat simptome de long COVID, cel mai frecvent oboseală, dureri articulare, probleme de memorie și dificultăți respiratorii. Femeile și pacienții cu forme severe ale bolii au avut un risc mai mare de a dezvolta long COVID, iar comorbiditățile, în special dislipidemia, au fost corelate cu apariția simptomelor persistente. Tratamentele cu steroizi și Tocilizumabum nu au arătat o legătură semnificativă cu long COVID. De asemenea, pacienții cu long COVID au avut niveluri mai ridicate de anticorpi IgG anti-S1/S2, dar diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic.

## **5.4. Discuții referitoare la studiul 3**

Studiul nostru include 80 de pacienți, cu un echilibru între sexe și comorbidități, și arată că oboseala este cel mai frecvent simptom raportat, simiar cu alte studii (22), urmat de dispnee,

afectare cognitivă și artralгии. Față de alte studii (23), prevalența dispneei în cohorta noastră este mai mică, probabil din cauza unui număr redus de cazuri severe.

În ceea ce privește factorii de risc, am observat o asociere semnificativă între sexul feminin și riscul de long COVID, confirmând alte studii care arată date similare (24). Studiul nostru nu a identificat vârsta ca un factor de risc semnificativ pentru dezvoltarea long COVID, iar severitatea bolii în faza acută nu pare să aibă un impact asupra apariției simptomelor persistente. Aceste rezultate sunt în concordanță cu alte cercetări (21, 25), care nu au găsit o legătură semnificativă între vârstă sau severitatea infecției acute și long COVID.

Comorbiditățile, cum ar fi dislipidemia, au fost asociate cu un risc mai mare de long COVID în cohorta noastră.

Răspunsul imun, măsurat prin anticorpi IgG anti-S1/S2, nu a fost corelat semnificativ cu apariția simptomelor persistente. Aceste rezultate sunt în concordanță cu alte cercetări (26), care sugerează că răspunsul imun nu este suficient pentru a prezice long COVID. Totuși, unele studii sugerează o legătură între un răspuns umoral mai puternic și riscul de long COVID (27), iar cercetările viitoare ar trebui să examineze această relație în detaliu.

Limitările studiului includ dimensiunea mică a eșantionului și utilizarea unei singure metode serologice, ceea ce ar putea limita generalizarea rezultatelor. Monitorizarea pe termen lung este necesară pentru a înțelege pe deplin durata și severitatea simptomelor long COVID.

### **5.5. Concluziile studiului 3**

Studiul a evidențiat că sexul feminin și comorbiditățile preexistente sunt factori importanți în riscul de a dezvolta long COVID. În schimb, vârsta, severitatea bolii inițiale, tratamentele imunomodulatoare și anticorpii IgG anti-S1/S2 nu au fost semnificativ asociate cu apariția simptomelor. Deși nu toți factorii de risc au fost identificați, analiza dinamicii anticorpilor pe diferite perioade oferă perspective relevante asupra rolului acestora în dezvoltarea long COVID.

## Bibliografie selectivă

1. Acuti Martellucci C, Flacco ME, Cappadona R, Bravi F, Mantovani L, Manzoli L. SARS-CoV-2 pandemic: An overview. *Advances in Biological Regulation*. 2020;77:100736.
2. Theel ES, Harring J, Hilgart H, Granger D. Performance Characteristics of Four High-Throughput Immunoassays for Detection of IgG Antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(8).
3. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance. *Nature Biotechnology*. 2020;38(10):1174-83.
4. Van Elslande J, Decru B, Jonckheere S, Van Wijngaerden E, Houben E, Vandecandelaere P, et al. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(11):1557.e1-e7.
5. Favresse J, Eucher C, Elsen M, Gillot C, Van Eeckhoudt S, Dogné J-M, et al. Persistence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Depends on the Analytical Kit: A Report for Up to 10 Months after Infection. *Microorganisms*. 2021;9(3):556.
6. Havers FP, Reed C, Lim T, Montgomery JM, Klena JD, Hall AJ, et al. Seroprevalence of Antibodies to SARS-CoV-2 in 10 Sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Internal Medicine*. 2020;180(12):1576.
7. Zhang X, Lu S, Li H, Wang Y, Lu Z, Liu Z, et al. Viral and Antibody Kinetics of COVID-19 Patients with Different Disease Severities in Acute and Convalescent Phases: A 6-Month Follow-Up Study. *Virologica Sinica*. 2020;35(6):820-9.
8. Ng DL, Goldgof GM, Shy BR, Levine AG, Balcerak J, Bapat SP, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood from the San Francisco Bay Area. 2020.
9. Arkhipova-Jenkins I, Helfand M, Armstrong C, Gean E, Anderson J, Paynter RA, et al. Antibody Response After SARS-CoV-2 Infection and Implications for Immunity. *Annals of Internal Medicine*. 2021;174(6):811-21.
10. Brochot E, Demey B, Touzé A, Belouzard S, Dubuisson J, Schmit J-L, et al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11.

11. Pang NY-L, Pang AS-R, Chow VT, Wang D-Y. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Military Medical Research*. 2021;8(1).
12. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MIC, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology*. 2020;38(9):1073-8.
13. Muecksch F, Wise H, Templeton K, Batchelor B, Squires M, McCance K, et al. Longitudinal variation in SARS-CoV-2 antibody levels and emergence of viral variants: implications for the ability of serological assays to predict immunity. 2021.
14. Takheaw N, Liwsrisakun C, Chaiwong W, Laopajon W, Pata S, Inchai J, et al. Correlation Analysis of Anti-SARS-CoV-2 RBD IgG and Neutralizing Antibody against SARS-CoV-2 Omicron Variants after Vaccination. *Diagnostics*. 2022;12(6):1315.
15. ECDC. Variants of concern: ECDC; 2024 [updated July 2024. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
16. Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bibi S, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine*. 2021;27(11):2032-40.
17. Schuh AJ, Satheshkumar PS, Dietz S, Bull-Otterson L, Charles M, Edens C, et al. SARS-CoV-2 Convalescent Sera Binding and Neutralizing Antibody Concentrations Compared with COVID-19 Vaccine Efficacy Estimates against Symptomatic Infection. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(4).
18. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, et al. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants. *Immunity*. 2021;54(8):1841-52.e4.
19. Kuzmina A, Wattad S, Khalaila Y, Ottolenghi A, Rosental B, Engel S, et al. SARS CoV-2 Delta variant exhibits enhanced infectivity and a minor decrease in neutralization sensitivity to convalescent or post-vaccination sera. *iScience*. 2021;24(12):103467.
20. WHO. Post COVID-19 condition (Long COVID): WHO; 2024 [updated April 2024. Available from: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>.

21. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infectious Diseases*. 2021;53(10):737-54.
22. Liang L, Yang B, Jiang N, Fu W, He X, Zhou Y, et al. Three-Month Follow-Up Study of Survivors of Coronavirus Disease 2019 after Discharge. *Journal of Korean Medical Science*. 2020;35(47).
23. Garrigues E, Janvier P, Kherabi Y, Le Bot A, Hamon A, Gouze H, et al. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. *Journal of Infection*. 2020;81(6):e4-e6.
24. Notarte KI, de Oliveira MHS, Peligro PJ, Velasco JV, Macaranas I, Ver AT, et al. Age, Sex and Previous Comorbidities as Risk Factors Not Associated with SARS-CoV-2 Infection for Long COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2022;11, 7314.
25. Peghin M, Palese A, Venturini M, De Martino M, Gerussi V, Graziano E, et al. Post-COVID-19 symptoms 6 months after acute infection among hospitalized and non-hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(10):1507-13.
26. Rank A, Tzortzini A, Kling E, Schmid C, Claus R, Löll E, et al. One Year after Mild COVID-19: The Majority of Patients Maintain Specific Immunity, But One in Four Still Suffer from Long-Term Symptoms. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(15):3305.
27. Klein J, Wood J, Jaycox J, Lu P, Dhodapkar RM, Gehlhausen JR, et al. Distinguishing features of Long COVID identified through immune profiling. 2022.

## Lista publicațiilor din tema tezei de doctorat

### Articole publicate in extenso

1. **Nedelcu I**, Jipa R, Vasilescu R, Baicus C, Popescu C, Manea E, Stoichitoiu L, Pinte L, Damalan A, Simulescu O, Stoica I, Stoica M, Hristea A, *Long-term longitudinal evaluation of six commercial immuno-assays for the detection of IgM and IgG antibodies against SARS CoV-2*, Viruses; 2021, 13(7), 1244, FI - 5,81/2021, Q2, capitolul II din teza de doctorat, pag. 45-47, 52-75  
<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/7/1244>
2. **Nedelcu I**, Florian P, Ion D, Militaru E, Damalan A, Popescu C, Hristea A, *Dynamics of serum cross-neutralization capacity against SARS-CoV-2 Delta variant in convalescent COVID-19 patients*, Journal of Medical Virology, 2024, 96:e29448. 9, FI – 6,8/2023(2024 update), Q1, capitolul II din teza de doctorat, pag. 48-51, 76-97  
<https://doi.org/10.1002/jmv.29448>
3. **Nedelcu I**, Militaru E, Damalan A, Băicuș C, Marin L, Hristea A, *Risk factors and antibody response associated with long COVID: longitudinal cohort study*, The Medical-Surgical Journal, 2024, 128(3), 490-498, FI – 0,1/2023, Q4, capitolul II din teza de doctorat, pag. 98-111  
<https://www.revmedchir.ro/index.php/revmedchir/article/view/3009>

### Abstracte publicate și prezentate la conferințe naționale

1. **Nedelcu I**, Damalan A, Vasilescu R, Jipa R, Manea E, Hristea A, *Validation of two serology assays commercially available in COVID 19 diagnosis*, The 13<sup>th</sup> National Congress of Infectious Disease COVID 19, Cluj-Napoca, Romania, 17-18 Oct 2020, capitolul II din teza de doctorat, pag. 45-47, 52-75. Abstract acceptat ca prezentare orală.

2. **Nedelcu I**, Damalan A, Vasilescu R, Jipa R, Manea E, Hristea A, *Factors influencing the production of IgG SARS-CoV-2 antibodies*, 16th Edition of the Scientific Days of the National Institute for Infectious Diseases“Prof Dr Matei Bals”, București, 26- 30 Oct, 2020, Volum de rezumate pag 6-7, capitolul II din teza de doctorat, pag. 45-47, 52-75. Abstract acceptat ca prezentare. Revistă indexată: ISSN 2457-8525
3. **Nedelcu I**, Neagu G, Vasilescu R, Jipa R, Manea E, Damalan A, Hristea A, *Influencing factors for anti SARS CoV-2 S1/S2 antibodies production determinated by a quantitative assay*, National Conference of Infectious Pathology, Iasi, 24-26 June, 2021, capitolul II din teza de doctorat, pag. 45-47, 52-75. Abstract acceptat ca prezentare orală.
4. **Nedelcu I**, Militaru E, Damalan A, Patrascu R, Hristea A, *Assessment of anti-SARS-CoV-2 antibodies using commercially available methods*, The 14th National Congress of Infectious Disease, Iasi, 20-22 octombrie, 2022, Volum de rezumate; 385-386, capitolul II din teza de doctorat, pag. 45-47, 52-75. Abstract acceptat ca prezentare orală. Revistă indexată ISBN 978-606-544-773-8
5. Popescu C, **Nedelcu I**, Florian P, Ion D, Militaru E, Damalan A, Costache A, Ionescu I, Onu A, Hristea A, *Dynamics of SARS CoV-2 cross-neutralizing antibody response in convalescent Covid-19 patients – molecular mechanisms involved in SARS CoV-2 seroneutralization*, HIV Sibiu Dialogues VI, 06-08 iunie, 2024, capitolul II din teza de doctorat, pag. 48-51, 76-97. Abstract acceptat ca prezentare orală.