

Gimnazija Kranj
Raziskovalna naloga

Naslov: **Tvorba protiteles pri bolnikih s SARS-CoV-2**

Raziskovalno vprašanje:

Ali starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na čas nastanka protiteles IgM in IgG pri hospitaliziranih bolnikih, okuženih s SARS-CoV-2?

Predmet: Biologija

Mentorica: Vanda Kukec, prof. biol.

Somentor: asist. dr. Boštjan Rituper, dr. med.

Ime in priimek: Eva Bitežnik

Datum: 26. 03. 2021

Gimnazija Kranj, Koroška 13

Za priložnost sodelovanja v študiji sem vsem raziskovalcem, izr. prof. dr. Petru Korošču, univ. dipl. biol., spec. lab. med. genetike; asist. dr. Boštjanu Rituperju, dr. med.; dr. Urški Stojković Bidovec, univ. dipl. biol. ter asist. Barbari Bitežnik, dr. med, spec. neizmerno hvaležna, saj sem se veliko naučila ter dobila inspiracijo za raziskovalno nalogo.

Zahvaljujem tudi dr. Juliju Šelbu, dr. med., spec. za pomoč pri multipli linearni regresiji.

Povzetek

Ali starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na čas nastanka protiteles IgM in IgG pri hospitaliziranih bolnikih, okuženih s SARS-CoV-2? V strokovni literaturi zaenkrat še ni podatkov o vplivu naštetih dejavnikov na nastanek protiteles proti SARS-CoV-2, zato sem se odločila, da raziščem, kako starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na hitrost pojavnosti specifičnih protiteles tipov IgM in IgG. V tej študiji so bila določena protitelesa tipov IgM in IgG, ki so usmerjena proti SARS-CoV-2.

Protitelesa so bila določana v serumu bolnikov, ki so bili hospitalizirani v Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo (UKPA) Golnik med 4. 9. 2020 in 27. 11. 2020 in so bili stari 24 do 99 let. Podatki o spolu, starosti, pridruženih boleznih in o rezultatu določanja protiteles z encimsko imunskimi testi (ELISA) so bili pridobljeni iz Excelove tabele, ki je nastala v okviru študije UKPA Golnik, iz bolnišničnega informacijskega sistema BIRPIS so bili pridobljeni podatki o datumu začetka simptomov. Podatki so bili zbrani v Excelovi tabeli, kjer so bili bolniki razdeljeni v skupine glede na starost (mlajši od 65 let ter 65 let in starejši), spol (moški in ženske) in pridružene bolezni (arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen, hiperlipidemija, respiratorne bolezni, kardiovaskularne bolezni, revmatološke bolezni ter stanje imunokompromitiranosti, malignom, renalne bolezni in ostale bolezni). Izračunano je bilo število dni od začetka simptomov do prvega pojava specifičnih protiteles katerega koli tipa, specifičnih protiteles tipa IgM in specifičnih protiteles tipa IgG. Podatki so bili grafično obdelani v programu GraphPad, izvedeni so bili Studentov t-test, test Mann-Whitney, Fisherjev eksaktni test ter multipla linearna regresija.

Glede na obstoječe študije o pojavnosti protiteles pri imunskem odzivu smo pričakovali hitrejšo pojavljanje protitelesa pri ljudeh mlajših od 65 let, pri ženskah in pri ljudeh brez pridruženih boleznih. Rezultati naše študije, z izjemo kasnejšega pojavljanja protiteles pri bolnikih z rakom, niso pokazali statistično značilnih razlik vpliva starosti, spola in pridruženih boleznih na čas nastanka pojavljanja protiteles.

Vsebina

Povzetek	3
Kazalo slik	5
Kazalo tabel	5
Predstavitev naloge	6
1.1 Virusi	6
1.1.1 SARS.....	6
1.1.2 COVID-19	7
1.2 Imunski sistem	9
1.3 Protitelesa	9
1.3.1 Dejavniki, ki vplivajo na tvorbo protiteles	10
Raziskava	11
2.1 Raziskovalni problem	11
2.1.1 Raziskovalno vprašanje.....	12
2.2 Hipoteza	12
2.3 Spremenljivke	12
2.4 Material, oprema	12
2.5 Metode dela in postopek	13
2.6 Rezultati in interpretacija rezultatov	13
2.6.1 Frekvenčna porazdelitev pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.....	15
2.6.2 Časovni potek pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	16
2.6.3. Frekvenčna porazdelitev pojavnosti protiteles pri sledenih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	17

2.6.4 Čas pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	18
2.6.5 Čas pojavnosti IgM in IgG protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	19
2.6.6 Pojavnost protiteles pri preživelih in umrlih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	20
2.6.7 Čas pojavnosti protiteles pri bolnikih mlajših od 65 let in bolnikih starih 65 let in več, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	21
2.6.8 Čas pojavnosti protiteles pri moških in ženskah, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	22
2.6.9 Multipla linearna regresija za pojavnost protiteles pri vseh bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2	23
Zaključek	25
Viri	26

Kazalo slik

SLIKA 1: SARS-COV-2 POD MIKROSKOPOM (NIAID, 2020)	7
SLIKA 2: FREKVENČNA PORAZDELITEV POJAVNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES TIPOV IGM ALI IGG PRI BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	15
SLIKA 3: ČASOVNI POTEK POJAVNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES TIPOV IGM ALI IGG PRI BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	16
SLIKA 4: FREKVENČNA PORAZDELITEV POJAVNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES TIPOV IGM ALI IGG PRI SLEDENIH BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	17
SLIKA 5: ČAS POJAVNOSTI SPECIFIČNIH IGM ALI IGG PROTITELES PRI BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	18
SLIKA 6: ČAS POJAVNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES TIPOV IGM IN IGG PRI BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	19
SLIKA 7: POJAVNOST PROTITELES PRI PREŽIVELIH IN UMRLIH BOLNIKI, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	20
SLIKA 8: ČAS POJAVNOSTI PROTITELES PRI BOLNIKI MLAJŠIH OD 65 LET IN BOLNIKI STARIH 65 LET IN VEČ, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	21
SLIKA 9: ČAS POJAVNOSTI PROTITELES PRI MOŠKI IN ŽENSKAH, HOSPITALIZIRANIH ZARADI OKUŽBE S SARS-COV-2	22

Kazalo tabel

TABELA 1: IZSEK TABELE, V KATERI SO ZBRANI VSI PODATKI	14
TABELA 2: TABELA MULTIPLE LINEARNE REGRESIJE	23

Predstavitev naloge

Na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo (UKPA) Golnik od junija 2020 opravljam delo na triaži preko študentskega servisa Mjob. Na pomoč sem priskočila tudi v času šolanja na daljavo, med drugim valom epidemije novega koronavirusa.

Na UKPA Golnik trenutno poteka študija, katere namen je ugotoviti, kako so celice T pomagalka (celice CD4+) povezane z visoko smrtnostjo pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2. Raziskovalci v študiji so izr. prof. dr. Peter Korošec, univ. dipl. biol., spec. lab. med. genetike; asist. dr. Boštjan Rituper, dr. med.; dr. Urška Stojković Bidovec, univ. dipl. biol. in asist. Barbara Bitežnik, dr. med, spec. V študiji sem sodelovala tudi sama, in sicer tako, da sem iz bolnišničnega informacijskega sistema pridobivala podatke, ključne za študijo, in jih vpisovala v tabele. Za raziskavo vpliva starosti, spola in pridruženih boleznih na nastanek protiteles pri bolnikih, okuženih s SARS-CoV-2 sem se odločila, ker se je po medijih veliko govorilo o protitelesih po preboleli okužbi s SARS-CoV-2, podatkov o tem, kaj v bistvu sploh vpliva na tvorbo protiteles pri okužbi s SARS-CoV-2 pa v strokovni literaturi zaenkrat še ni. V študiji so bila protitelesa že določena, prav tako starost, spol in pridružene bolezni, zato me je zanimalo, ali se pri določenih skupinah bolnikov, razporejenih po teh dejavnikih, protitelesa pojavljajo pozneje glede na datum začetka simptomov.

1.1 Virusi

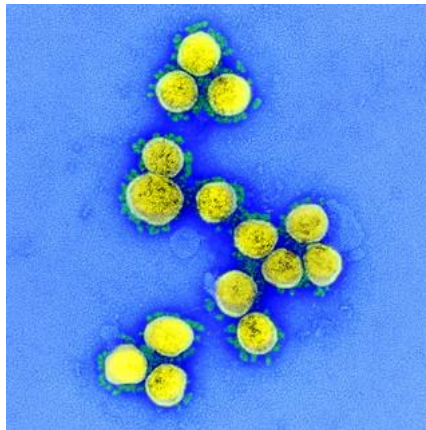
Virusi so majhni paraziti, ki ne spadajo med žive organizme. Zgrajeni so iz nukleinske kisline (DNA ali RNA), ki je dedni material in je vir informacij za nastanek virusnih proteinov, obdane z beljakovinskim plaščem oziroma kapsido. Ovojnica nekaterih virusov je zgrajena iz lipidnega dvosloja in beljakovin. Virusni nimajo lastnih encimov, potrebnih za metabolne procese, zato se sami ne morejo odzivati na okolje ter razmnoževati in potrebujejo gostiteljsko celico. Virusni celične organele (npr. ribosome), beljakovine in celično energijo gostiteljske celice uporabijo za svoj obstoj in razmnoževanje. Pri izdelovanju virusnih delov lahko pride do poškodb in propadanja gostiteljskih celic, pri čemer se novonastali virusi izločijo iz celice. Virusni se s pomočjo gostiteljske celice razmnožujejo tako, da vgradijo virusni dedni material v dedni material gostiteljske celice, ki se na ta način prenaša na celice potomke (La Morte, 2016).

1.1.1 SARS

Pod imenom SARS je poleg virusa SARS-CoV in virusa SARS-CoV-2 znan tudi hudi respiratorni akutni sindrom. Gre za nalezljivo bolezen dihal, ki se je prvič pojavila na Kitajskem novembra 2002. Povzročja ga koronavirus (SARS-CoV), ki se najpogosteje prenaša kapljično, redkeje pa prek kontaminiranih površin. Inkubacijska doba znaša 2 do 10 dni, kar je dlje, kot pri večini drugih respiratornih virusov. Med simptome SARSa spadajo glavobol, visoka vročina

s spremljajočo mrzlico, bolečine v mišicah in sklepih, utrujenost, suh dražeč kašelj, dispneja, driska ter bruhanje. SARS so najprej diagnosticirali z izključitvijo drugih vzrokov pljučnice. Laboratorijsko diagnozo postavimo s serološkimi metodami, molekularnimi metodami (RT-PCR) ali kultivacijo virusa. Za dokaz protiteles proti SARS-CoV se uporablja indirektna fluorescenčna metoda ali encimsko imunski test (ELISA). Bolniki z blagimi bolezenskimi simptomi se zdravijo v domači oskrbi, bolniki s hujšimi bolezenskimi simptomi pa so sprejeti v rdečo cono bolnišnice (Trampuž et al., 2003).

1.1.2 COVID-19



Slika 1: SARS-CoV-2 pod mikroskopom (NIAID, 2020)

Koronavirusno bolezen (COVID-19) povzroča koronavirus SARS-CoV-2, ki je prepoznaven po obliki krone in spada med betakoronaviruse. Sprva je bil poimenovan 2019-nCoV (2019 novi koronavirus), nato pa ga je Mednarodna komisija za taksonomijo virusov preimenovala v SARS-CoV-2 (Ouassou et al., 2020).

Virus je bil prvič izoliran v kitajskem mestu Wuhan decembra 2019, in sicer pri bolnikih, ki so bili hospitalizirana zaradi pljučnice neznanega izvora. Prvi bolniki so bili epidemiološko povezani s tržnico z morsko hrano, kjer se je virus verjetno prenesel z živali na človeka, nato pa se je začel širiti s človeka na človeka (Ouassou et al., 2020).

SARS-CoV-2 se med ljudmi prenaša predvsem kapljično, manj verjeten, ampak možen, pa je aerogen prenos (z aerosoli) in prenos preko kontaminiranih površin (Ouassou et al., 2020).

Prenos lahko preprečimo z uporabo ustreznih zaščitnih obraznih mask, z razkuževanjem rok in površin (Ouassou et al., 2020).

Med simptome okužbe s SARS-CoV-2 spadajo vročina s spremljajočo mrzlico, suh dražeč kašelj, utrujenost, bolečine v mišicah ter sklepih, dispneja, izguba okusa in vonja, driska in bruhanje. Okužba lahko poteka tudi asimptomatsko (Ouassou et al., 2020).

Laboratorijsko okužbo z virusom SARS-CoV-2 dokažemo z enakimi metodami kot okužbo s SARS-CoV (Trampuž et al., 2003).

Približno 80 % primerov okužb s SARS-CoV-2 poteka v blažji obliki, pri 20 % obolelih je potek bolezni težji (Ouassou et al., 2020).

Bolnike, okužene z novim koronavirusom, je potrebno vsaj 10 dni od začetka simptomov ali pozitivnega testa izolirati. Osebe, okužene s SARS-CoV-2, so kužne 2 dni pred začetkom simptomov in še 10 dni po začetku simptomov. Osebe s hujšim potekom bolezni so lahko kužne tudi 14 do 20 dni od začetka simptomov ("Koronavirus – pogosta vprašanja in odgovori", b. d.).

Za zdravljenje bolnikov, hospitaliziranih zaradi COVID-19, je po vsem svetu odobreno protivirusno zdravilo remdesivir. Bolnik, ki potrebuje dodatek kisika, so skladno z lokalnimi smernicami zdravljeni tudi s protivnetnim zdravilom deksametazon, v primeru pomanjkanja deksametazona so ustrezni tudi prednizon, metilprednizolon in hidrokortizon ("Coronavirus disease 2019 (COVID-19) - Diagnosis and treatment", b. d.).

Med priporočila za zdravljenje okužbe na domu spadajo počitek, ustrezna hidracija, sirup za izkašljevanje ter zdravila za znižanje telesne temperature (antipiretiki) ("Coronavirus disease 2019 (COVID-19) - Diagnosis and treatment", b. d.).

Cepiva proti COVID-19 v človeškemu telesu spodbudijo razvoj imunosti (protiteles) proti SARS-CoV-2. Kot posledica cepljenja v telesu nastanejo spominski limfociti T in limfociti B, ki proizvajajo protitelesa in so ključni za zaščito pred okužbo z novim koronavirusom. Proti SARS-CoV-2 so razvili tri vrste cepiv: mRNA cepivo, cepivo z beljakovinsko podskupino in vektorska cepiva ("Understanding How COVID-19 Vaccines Work", b. d.).

mRNA cepivo vsebuje sporočevalno RNA (mRNA) virusa SARS-CoV-2, ki celicam v človeškem telesu da navodilo, kako izdelati neškodljivo beljakovino, ki je edinstvena za virus. Po izdelavi beljakovine celice prepoznajo genetski material cepiva kot tujek in tvorijo limfocite T in limfocite B. Zaradi imunskega spomina si organizem zapomni, kako se braniti pred virusom, če pride do okužbe ("Understanding How COVID-19 Vaccines Work", b. d.).

Cepivo z beljakovinsko podskupino vsebuje beljakovino virusa. Po cepljenju organizem zazna beljakovino kot tujek in proti njej tvori limfocite T in protitelesa, ki si zapomnijo, kako tvoriti imunski odziv ob morebitni okužbi s SARS-CoV-2 ("Understanding How COVID-19 Vaccines Work", b. d.).

Vektorsko cepivo vsebuje za človeka nenevaren virus, v katerega je vgrajen antigen SARS-CoV-2. Virusni vektor celicam organizma da navodilo za izdelavo virusne beljakovine. Organizem proizvede limfocite T in limfocite B, ki delujejo na enak način, kot pri mRNA cepivih ("Understanding How COVID-19 Vaccines Work", b. d.).

1.2 Imunski sistem

Imunski sistem sestavljajo fizične ovire, celice in molekule, ki so specializirane za obrambo organizma pred okužbo (Delves & Roitt, 2000). Pomemben del imunskega sistema so bele krvne celice oziroma levkociti, ki zaznavajo povzročitelje bolezni in proti njim sprožijo ustrezní obrambni odgovor. Ločimo prirojeno in pridobljeno imunost. Prirojena oziroma naravna imunost vključuje mehanizme obrambe pred povzročitelji bolezni, ki so usmerjeni proti širokemu naboru povzročiteljev bolezni in ne zahtevajo poprejšnjega srečanja z njimi (Dolenc Koce et al., 2018). Za boj proti virusom je pomembnejša pridobljena imunost. Ločimo humoralno in celično posredovano pridobljeno imunost. Za humoralni imunski odziv je značilen nastanek specifičnih protiteles oz. imunoglobulinov, ki sodelujejo pri uničenju virusov in bakterij ali pri nevtralizirajo njihove toksine. Protitelesa izdelujejo limfociti B. Za celično posredovano imunost je značilna aktivacija limfocitov T, ki uničujejo okužene celice (Vozelj, 2000). Da je lahko specifičen imunski odziv uspešen, je nujno predhodno srečanje s specifičnim povzročiteljem bolezni (Dolenc Koce et al., 2018). Takšnemu srečanju sledi nastanek spominskih celic, ki se ob ponovnem srečanju z istim povzročiteljem hitro aktivirajo in preprečijo razvoj bolezni. Temu pravimo imunski spomin (Vozelj, 2000).

1.3 Protitelesa

Imunoglobuline (Ig) oz. protitelesa v telesu najdemo v nevezani (prosti) obliki, ki krožijo po telesu v krvi in se izločajo na sluznice, ter na celično membrano vezani obliki. Oba tipa imunoglobulinov izločajo aktivirani limfociti B, ki jim pravimo plazmatke. Poznamo protitelesa tipov IgG, IgA, IgM, IgE in IgD (Vozelj, 2000).

Protitelesa IgG so monomerne molekule, ki nastajajo ob okužbi ali imunizaciji (cepljenju) z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti. Najdemo jih v krvi in tkivnih tekočinah. Življenjska doba imunoglobulinov IgG je med vsemi tipi imunoglobulinov najdaljša, v krvi ostanejo do 40 dni. IgG protitelesa so prilagojena za nevtralizacijo toksinov in pospeševanje odstranjevanja povzročiteljev bolezni s pomočjo imunskih celic fagocitov (fagocitoze) (Vozelj, 2000).

Protitelesa IgM nastanejo pri skoraj vseh vrstah imunskih odzivov. Pri primarnem imunskem odzivu (specifični imunski odziv ob prvem stiku z antigenom, ki nastane v nekaj tednih), jih najdemo prej kot protitelesa IgG in, na začetku, tudi v večjih količinah. So polireaktivna, kar pomeni, da se lahko vežejo z vsaj dvema različnima antigenoma (Vozelj, 2000).

Protitelesa so prva obrambna črta pri vdoru povzročiteljev bolezni in se vežejo z različnimi virusi, mikroorganizmi, bakterijami, protoziji, paraziti in glivami (Vozelj, 2000).

1.3.1 Dejavniki, ki vplivajo na tvorbo protiteles

Na imunski odziv oziroma izdelavo protiteles vpliva več dejavnikov. Dejavniki, ki glede na obstoječo znanstveno literaturo vplivajo na izdelavo protiteles, so nekatere pridružene bolezni, starost, spol, genetske značilnosti, perinatalni dejavniki pri dojenčkih, geografska lokacija, okolje, vedenjski dejavniki (kajenje, telesna aktivnost, uživanje alkohola, stres (kronični in akutni)), spanec, stanje prehranjenosti, pomanjkanje vitaminov A, D in E, stanja imunske pomanjkljivosti (obsevanje, kortikosteroidi, antimetaboliti, antilimfocitni serum, primarne imunske pomanjkljivosti), adjuvansi, multipli antigeni, monoklonalna protitelesa in količina antigena (Cuffari, 2021; Parija. b. d.).

1.3.1.1 Vpliv starosti na tvorbo protiteles

Starost ima na imunski sistem, tako kot na veliko drugih telesnih funkcij, negativen vpliv. S staranjem se nastajanje limfocitov, ki so ključni za sintezo protiteles, v kostnem mozgu in timusu upočasnijo, delovanje zrelih limfocitov pa je manj učinkovito, zato postane organizem bolj dovzeten za okužbe (Montecino-Rodriguez, 2013). Manj učinkovita sta oba, prirojena in pridobljena imunska odziva. Pri mlajših osebah je nastajanje limfocitov in njihov prehod v sekundarne limfatične organe (npr. v vranico) učinkovitejše, zato se lahko tako prirojena, kot pridobljena imunska odziva hitreje odzoveta na okužbo (Gruver et al., 2007). Imunski sistem začne pri moških slabeti med 62. in 64. letom, medtem ko se to pri ženskah zgodi med 66. in 71. letom (Wanner, 2020).

1.3.1.2 Vpliv spola na tvorbo protiteles

Na tvorbo protiteles vpliva tudi spol, kar povezujemo s spolnimi hormoni estrogenom, progesteronom in testosteronom ter geni, ki jih najdemo na kromosomih X in Y (Oertelt-Prigione, 2012). Ženske imajo običajno boljši imunski odziv na virusne okužbe, kar pomeni, da je obremenitev s virusnimi delci manjša in se le-ti hitreje uničijo. Istočasno pa so ženske bolj dovzete za avtoimunske bolezni (Ruggieri, 2016).

Spolni hormoni vplivajo na celice imunskega sistema kvalitativno in kvantitativno, in sicer tako da modulirajo njihove odzive. Estrogen spodbuja nastajanje protiteles tipov IgG in IgM, medtem ko testosteron nastajanje protiteles zavira (Ruggieri, 2016).

Na imunski odziv vplivajo tudi geni, ki so zapisani na kromosomih X in Y. Številni geni na kromosomu X kodirajo beljakovine, ki so povezane s funkcijami imunskega sistema. Z geni na kromosomu X so povezane tudi bolezni imunskega sistema. Ženske imajo dve kopiji kromosoma X, medtem ko imajo moški eno. To pomeni, da so moški bolj podvrženi boleznim, ki se dedujejo s kromosomom X, saj obstaja večja verjetnost, da se bolezen zaradi tega izrazi. Temu pravimo fenomen kromosoma X. Ženske zaradi opisanega fenomena redkeje zbolejajo

za boleznimi, ki se dedujejo preko kromosoma X (npr. rdeče-modra barvna slepota, hemofilija) (Ruggieri, 2016).

1.3.1.3 Vpliv pridruženih bolezni na tvorbo protiteles

Kronične bolezni so nenalezljive bolezni, ki trajajo vsaj eno leto in zahtevajo nenehno zdravniško spremljanje ter pogosto omejujejo vsakdanje življenje. Kardiovaskularne bolezni spodbujajo staranje celic T in neustrezen vnetni odziv. Sladkorna bolezen tipa 2 zaradi kronično zvišanih vrednosti krvne glukoze spodbuja nastanek končnih produktov pospešene glikacije (t.j. neencimske vezave molekul glukoze na različne molekule – AGE) in posledično vodi v provnetno stanje, ki oslabi imunski sistem. Arterijska hipertenzija spodbudi infiltracijo celic T v obžilno tkivo, oksidativni stres, moteno od endotelijskih celic odvisno vazodilatacijo in izražanje provnetnega dejavnika TNF- α . Poveča se izražanje provnetnih interlevkinov in izražanje avtoimunskega fenotipa, ki povzroča žilne poškodbe ter inducira aktivacijo celic Th17, posebne oblike celic T pomagalk, ki spodbujajo vnetje. Maligna (rakava) bolezen preko različnih mehanizmov, med drugih tudi zaradi posledic zdravljenja (kemoterapija, obsevanje,...) oslabi imunski sistem ter povzroči motnje delovanja in izčrpanost imunskih celic. Bolniki z respiratornimi boleznimi (KOPB, astma...) imajo okvarjeno mukocilirano funkcijo, kar olajša vstop virusa v celice respiratornega epitelijskega tkiva in lahko vodi v neustrezno izražanje molekul, ki spodbujajo vnetje oziroma neustrezno aktivacijo prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (Gómez-Verjan, 2020).

Raziskava

2.1 Raziskovalni problem

Raziskava je potekala v UKPA Golnik med 4. 9. 2020 in 27. 11. 2020. V raziskavo je bilo vključenih 177 bolnikov.

Pri 155-ih bolnikih je bil lahko natančno opredeljen datum začetka simptomov okužbe s SARS-CoV-2. Z raziskavo se je proučeval vpliv starosti, spola in pridruženih bolezni (arterijska hipertenzija (AH), sladkorna bolezen (SB), hiperlipidemija (HLP), respiratorne bolezni, kardiovaskularne (KVS) bolezni, revmatološke bolezni in stanja imunokompromitiranosti, malignom, renalne bolezni in ostale bolezni) na čas nastanka protiteles tipov IgM in IgG pri hospitaliziranih bolnikih, okuženih s SARS-Cov-2.

2.1.1 Raziskovalno vprašanje

Ali starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na čas nastanka protiteles IgM in IgG pri hospitaliziranih bolnikih, okuženih s SARS-CoV-2?

2.2 Hipoteza

Hipoteza: Starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na čas nastanka protiteles pri okužbi s SARS-CoV-2.

Glede na podatke iz znanstvene literature (Causes, consequences, and reversal of immune system aging, 2013; Immunosenescence of ageing, 2007) se pri starejših osebah manj pogosto in kasneje tvorita oba tipa protiteles.

Glede na podatke iz znanstvene literature (The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination, 2016; The influence of sex and gender on the immune response, 2012) se predvideva, da bo tvorba obeh tipov protiteles hitrejša pri ženskem spolu.

Glede na podatke iz znanstvene literature (When Chronic Diseases Meet Infectious Diseases: A Proposal Toward Healthy Aging: Lessons from COVID-19 Outbreak, 2020) se pri osebah s pridruženimi boleznimi manj pogosto in počasneje tvorita oba tipa protiteles kot pri zdravih osebah.

2.3 Spremenljivke

Odvisna spremenljivka: tvorba protiteles tipov IgM in IgG

Neodvisna spremenljivka: spol, starost, pridružene bolezni

2.4 Material, oprema

Določanje protiteles

- Set ELISA IgM
- Set ELISA IgG
- Serum krvi

Zbiranje podatkov o starosti, spolu, pridruženih boleznih in datumu začetka simptomov

- Bolnišnični informacijski sistem BIRPIS

Obdelovanje podatkov

- Microsoft Excel (Microsoft Inc., ZDA)
- GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., ZDA)

2.5 Metode dela in postopek

Glede na strokovno literaturo ("Quantitative Research Methods", 2014) je raziskava kvantitativna, retrospektivna in kohortna.

Uporabljene statistične metode so glede na strokovno literaturo (Ali & Bhaskar, 2016) opisne (povprečna vrednost, standardna deviacija, mediana, normalna distribucija) in inferenčne (Studentov t-test za dva neodvisna vzorca, test Mann-Whitney, Fisherjev eksaktni test in multipla linearna regresija).

Medicinsko osebje je na akutnih COVID oddelkih UKPA Golnik v povprečju vsakih 2 – 3 dni hospitaliziranim bolnikom med 4. 9. in 27. 11. 2020 odvzemalo vzorce krvi, v katerih se je v Imunološkem laboratoriju Klinike Golnik ugotavljala prisotnost protiteles tipov IgM in IgG, usmerjenih proti SARS-CoV-2. Protitelesa so se določala s pomočjo encimsko imunske metode (ELISA). Ključni podatki o bolnikih in rezultatih določitve protiteles so se vnesli v Excelovo (Microsoft) tabelo. Podatki o datumu pričetka simptomov okužbe so bili pridobljeni iz bolnišničnega informacijskega sistema BIRPIS. S pomočjo pridobljenih podatkov je bilo izračunano število dni od začetka simptomov do pojava protiteles.

Bolniki so bili razporejeni v skupine glede na spol (ženske, moški), starost (mlajši od 65 let, 65 let in starejši) in pridružene bolezni (AH, SB, HLP, respiratorne bolezni, KVS bolezni, revmatološke bolezni in stanja imunokompromitiranosti, malignom, renalne bolezni in ostale bolezni).

Rezultati so bili statistično obdelani v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, ZDA). Uporabljeni so bili Studentov T-test za dva neodvisna vzorca, test Mann-Whitney, Fisherjev eksaktni test in multipla linearna regresija. Za prikaz podatkov v grafični obliki je bil uporabljen program GraphPad Prism.

Za izvedbo študije je bilo predhodno pridobljeno soglasje Etične komisije.

Varnost pri delu: varstvo osebnih podatkov (podpisana pogodba o nerazkritju podatkov)

2.6 Rezultati in interpretacija rezultatov

V raziskavo je bilo zajetih 177 bolnikov. Protitelesa tipov IgM ali IgG so bila laboratorijsko zaznana pri 128 bolnikih od 155 bolnikov s preverljivim datumom začetka simptomov. Ti bolniki in bolniki, pri katerih se protitelesa katerega koli tipa niso pojavila, so bili vključeni v statistično analizo. Pri 55 bolnikih so bili vzorci krvi odvzeti v časovnih intervalih tako, da je bilo možno natančno opredeliti število dni, potrebnih za nastanek protiteles. To so tudi bolniki, pri katerih pred laboratorijsko dokazano prisotnimi protitelesi vsaj enkrat protitelesa laboratorijsko niso bila potrjena (t.i. sledeni bolniki).

Tabela 1 prikazuje izsek celotne tabele, v kateri so zbrani vsi podatki potrebni za raziskavo. Izsek tabele je prikazan, ker je celotna tabela preobsežna za vstavitve v dokument. V celoti je

tabela dostopna po dogovoru. V tabeli 1 so prikazani oznaka bolnika, število dni od datuma začetka simptomov do prvega pojava protiteles katerega koli tipa (1. pojav Ab), število dni od datuma začetka simptomov do prvega pojava specifičnih protiteles tipa IgM (1. pojav IgM), število dni od datuma začetka simptomov do prvega pojava specifičnih protiteles tipa IgG (1. pojav IgG), starost, spol in podatek o pridruženih boleznih (0 pomeni, da bolnik nima pridruženih boleznih, 1 pomeni, da ima bolnik pridružene bolezni). V celotni tabeli so pridružene bolezni razdeljene še na arterijsko hipertenzijo, sladkorno bolezen, hiperlipidemijo, respiratorne bolezni, kardiovaskularne bolezni, revmatološke bolezni in stanje imunokompromitiranosti, renalne bolezni, malignom in ostale bolezni. Vključeno je tudi število pridruženih boleznih posameznega bolnika in ali je bil bolnik sleden.

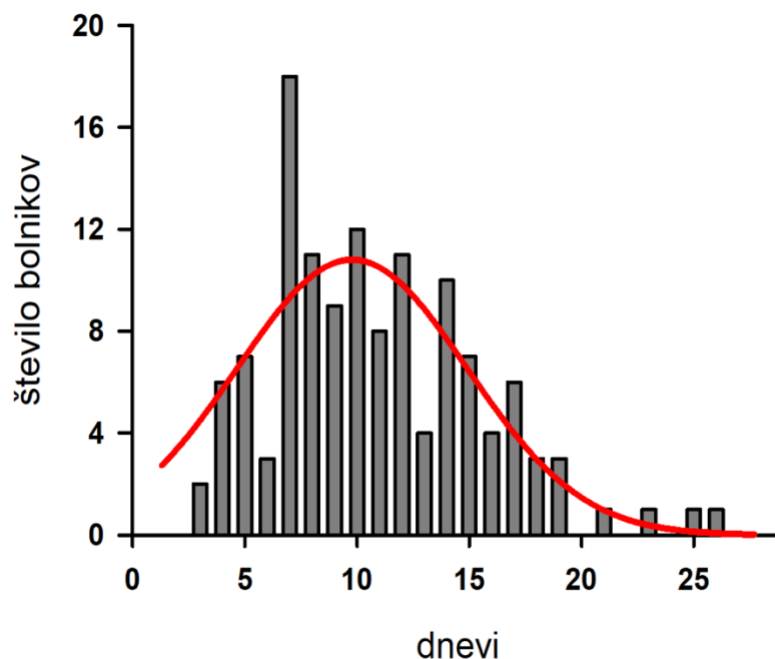
V tabeli 1 X pomeni, da bolnik nima znanega datuma začetka simptomov, zato ni mogoče določiti, v koliko dneh so se protitelesa pojavila. Oznaka / pomeni, da protitelesa pri bolniku niso bila zaznana.

Oznaka bolnika	Protitelesa			Starost	Spol	Pridružene bolezni
	1. pojav Ab	1. pojav IgM	1. pojav IgG			
BOLNIK 1	18	18	18	79	M	1
BOLNIK 2	13	16	13	81	M	1
BOLNIK 3	X	X	X	33	Ž	0
BOLNIK 4	21	/	21	62	Ž	1
BOLNIK 5	9	9	11	52	M	1
BOLNIK 6	15	15	17	76	Ž	1
BOLNIK 7	11	11	11	90	Ž	1
BOLNIK 8	12	/	12	72	Ž	1
BOLNIK 9	17	17	17	76	M	1
BOLNIK 10	3	8	3	83	Ž	1

Tabela 1: izsek tabele, v kateri so zbrani vsi podatki

2.6.1 Frekvenčna porazdelitev pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

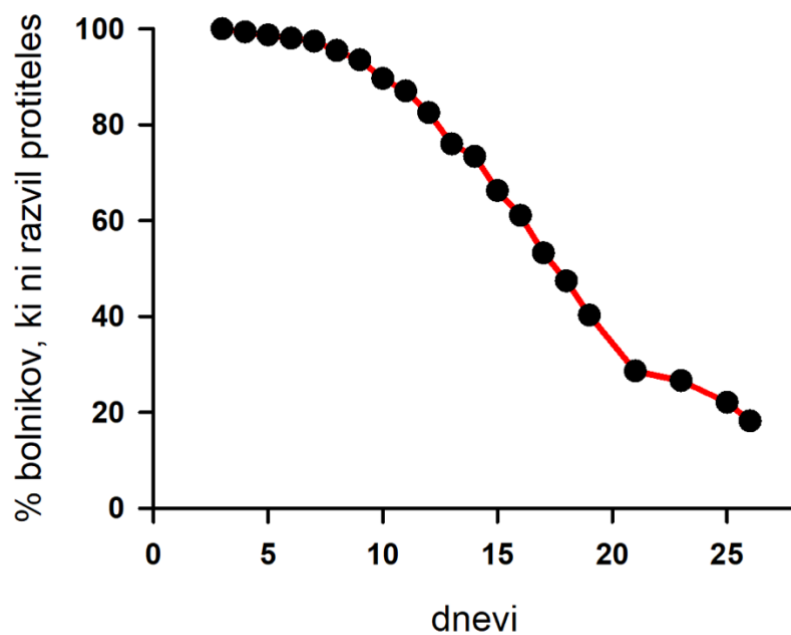
Na začetku smo želeli opredeliti, kako hitro se pri hospitaliziranih bolnikih pojavijo specifična anti-SARS-CoV-2 protitelesa. Slika 2 prikazuje frekvenčno porazdelitev dneva prve laboratorijske detekcije protiteles tipov IgM ali IgG pri 128 bolnikih, hospitaliziranih v UKPA Golnik zaradi okužbe s SARS-CoV-2, ki so bili zajeti v študijo in pri katerih je bil laboratorijsko dokazan nastanek specifičnih protiteles. Razpon grafa po dnevih znaša od 3 do 26 dni. Pri največ bolnikih (18) so se protitelesa pojavila sedem dni po pričetku simptomov. Rdeča (Gaussova) krivulja predstavlja normalno razporeditev (distribucijo), prilagojeno populaciji v študijo zajetih bolnikov. Vrh Gaussove krivulje je pri 10 dnevih, standardna deviacija znaša 5 dni. V povprečju se torej protitelesa pojavijo 10 dni po pojavu prvih simptomov. Po empiričnem pravilu so se v intervalu od 5 do 15 dni (ena standardna deviacija protitelesa pojavila pri 68 % bolnikov, v intervalu od 0 do 20 dni (dve standardni deviaciji) pri 95 % bolnikov, v intervalu od 0 do 25 dni pa pri 99,7 % bolnikov. Pri nekaterih bolnikih so bila protitelesa dokazana že 3 dni po začetku simptomov, pri nekaterih pa šele po 26 dnevih.



Slika 2: Frekvenčna porazdelitev pojavnosti specifičnih protiteles tipov IgM ali IgG pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

2.6.2 Časovni potek pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

V nadaljevanju smo želeli opredeliti, kolikšen delež bolnikov je po določenem času še brez specifičnih protiteles. Slika 3 prikazuje delež bolnikov, pri katerih se v določenem časovnem obdobju protitelesa še niso pojavila. V analizo so bili zajeti bolniki, vključeni v študijo, ki so se jim protitelesa pojavila in imajo preverljiv datum začetka simptomov, ter bolniki, ki se jim protitelesa niso pojavila. Skupno število bolnikov obeh skupin znaša 155. Prisotnost protiteles je bila pri bolnikih laboratorijsko dokazana že po treh dneh od pojava simptomov. Po 25 dneh protitelesa niso bila uspešno dokazana pri ca. 20 % bolnikov.



Slika 3: Časovni potek pojavnosti specifičnih protiteles tipov IgM ali IgG pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

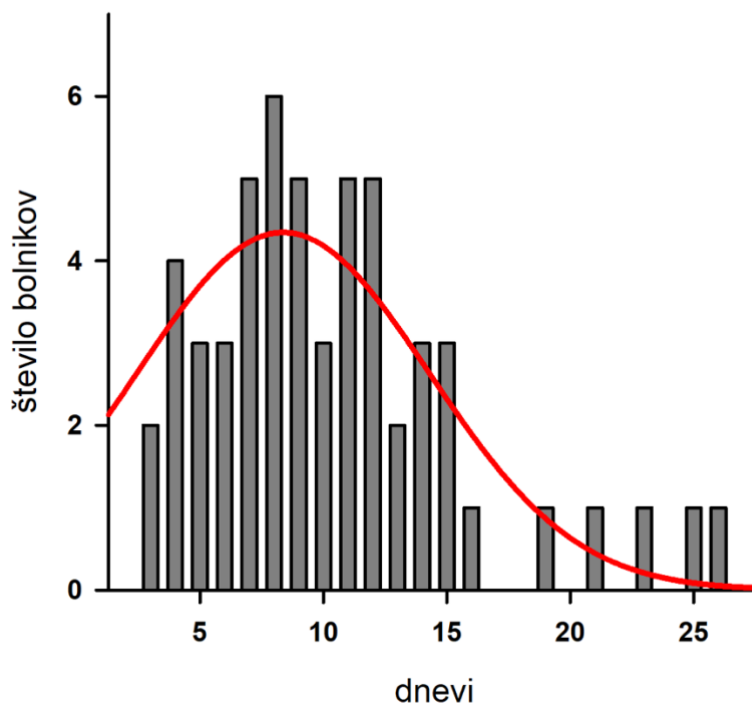
2.6.3. Frekvenčna porazdelitev pojavnosti protiteles pri sledenih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

Ker pri vseh bolnikih, vključenih v raziskavo, ni bilo mogoče natančno opredeliti števila dni do pojava protitelesa, smo opravili ločeno statistično analizo le pri bolnikih, pri katerih je bilo to mogoče. To so bolniki, pri katerih pred laboratorijsko dokazano prisotnimi protitelesi vsaj enkrat protitelesa laboratorijsko niso bila potrjena (t.i. sledeni bolniki).

Slika 4 prikazuje frekvenčno porazdelitev dneva prve laboratorijske potrditve protiteles tipov IgM ali IgG pri 55 sledenih bolnikih, hospitaliziranih v Kliniki Golnik zaradi okužbe s SARS-CoV-2. Razpon grafa po dnevih znaša 3 do 26 dni. Pri največ bolnikih (6) so se protitelesa pojavila osem dni po pričetku simptomov.

Rdeča krivulja predstavlja normalno porazdelitev, prilagojeno populaciji v študijo zajetih sledenih bolnikov. Vrh krivulje je pri 8 dneh, standardna deviacija znaša 6 dni. To pomeni, da so se pri 68% bolnikov protitelesa pojavila v intervalu od 2 do 14 dni. Pri 95 % bolnikov so se protitelesa pojavila v intervalu od 0 do 20 dni. Pri 99,7 % bolnikov so se protitelesa pojavila med 0 in 26-imi dnevi.

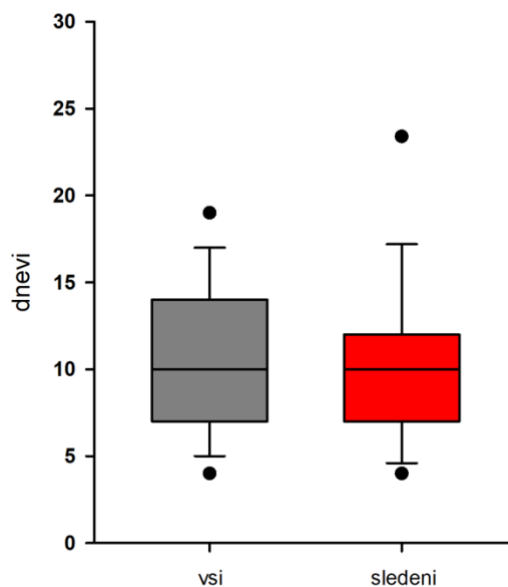
Skupina sledenih bolnikov predstavlja le del populacije, zajete v študijo. Za to skupino bolnikov je čas nastanka protiteles natančno opredeljen. Ker bi izključitev preostalih bolnikov pomembno zmanjšala moč statističnih rezultatov, je bilo preverjeno, če se obe skupini bolnikov (torej sledena skupina in skupina, pri kateri so bila dokazana protitelesa) statistično razlikujeta v času nastanka protiteles (Slika 5).



Slika 4: Frekvenčna porazdelitev pojavnosti specifičnih protiteles tipov IgM ali IgG pri sledenih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

2.6.4 Čas pojavnosti protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

Slika 5 prikazuje statistične značilnosti časa pojavnosti protiteles tipov IgM ali IgG pri vseh 128 v študijo vključenih bolnikih in pri 55 sledenih bolnikih. Ker ima skupina sledenih bolnikov značilnosti mejno normalne razporeditve, so podatki predstavljeni v obliki škatle z brki. Mediana pojavnosti protiteles pri vseh 128 bolnikih in pri 55 sledenih bolnikih znaša 10 dni. V medčetrtnskem razmiku (škatli) je prikazanih 50 % podatkov, na vsakem izmed brkov je prikazanih 25 % podatkov. Polovici vseh bolnikov so se protitelesa razvila med približno osmimi in štirinajstimi dnevi. Polovici sledenih bolnikov so se protitelesa pojavila med približno osmimi in enajstimi dnevi. Četrtni vseh bolnikov in četrtni sledenih bolnikov so se protitelesa pojavila med približno petimi in osmimi dnevi. Četrtni vseh bolnikov so se protitelesa pojavila med približno štirinajstimi in sedemnajstimi dnevi. Četrtni sledenih bolnikov so se protitelesa pojavila med približno enajstimi in sedemnajstimi dnevi. Skupini sta bili statistično primerjani s testom Mann-Whitney. Izračunana vrednost p znaša 0,43, kar pomeni, da med vsemi bolniki in sledenimi bolniki ni statistično značilnih razlik. V nadaljevanju so zato v statistično analizo vključeni vsi bolniki.

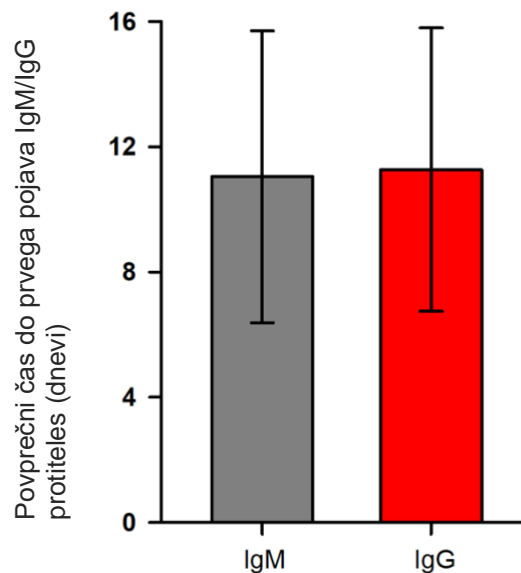


Slika 5: Čas pojavnosti specifičnih IgM ali IgG protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

2.6.5 Čas pojavnosti IgM in IgG protiteles pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

V nadaljevanju nas je zanimalo, kateri tip protiteles se pri bolnikih pojavi prej. Slika 6 prikazuje statistične značilnosti časa pojavnosti protiteles tipa IgM (dokazan pri 102 bolnikih) in tipa IgG (dokazan pri 124 bolnikih). Protitelesa tipa IgM so se v povprečju pojavila po 11 dneh, standardna deviacija, ki je na stolpičnem prikazu predstavljena z linijo, znaša 5 dni. Protitelesa tipa IgG so se v povprečju pojavila po 11 dneh, standardna deviacija znaša 5 dni. To pomeni, da so se pri 68% bolnikov protitelesa obeh tipov pojavila v intervalu od 6 do 16 dni. Pri 95 % bolnikov so se protitelesa obeh tipov pojavila v intervalu od 1 dneva do 21 dni. Pri 99,7 % bolnikov so se protitelesa obeh tipov pojavila v intervalu od 0 do 26 dni.

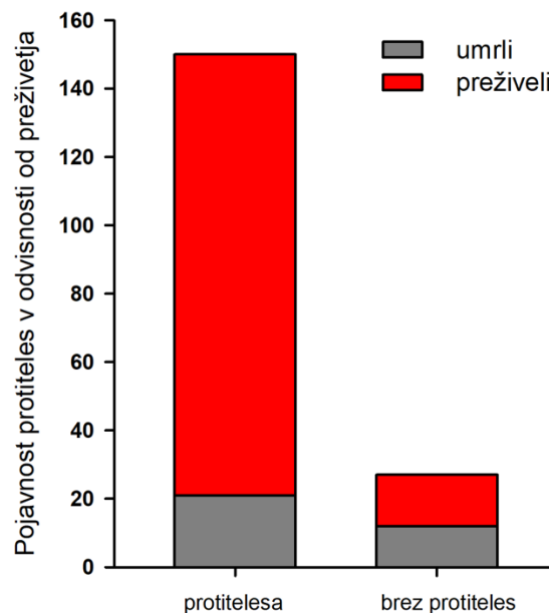
Statistično sta bili skupini primerjani s Studentovim T-testom. Izračunana je bila vrednost p, ki znaša 0,71, kar pomeni, da ni statistično značilnih razlik v času pojavnosti med protitelesa tipov IgM in IgG. (Slika 6).



Slika 6: Čas pojavnosti specifičnih protiteles tipov IgM in IgG pri bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

2.6.6 Pojavnost protiteles pri preživelih in umrlih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

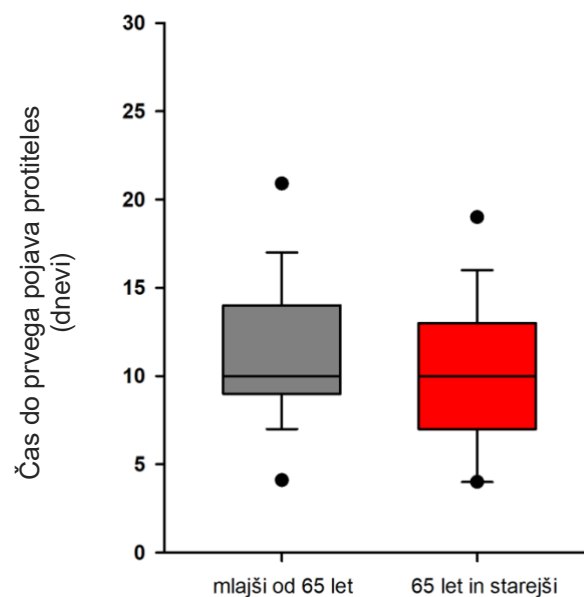
Pri okoli 20 % bolnikov poteka okužba v težji obliki in približno 2 – 3 % bolnikov zaradi okužbe umre (Ouassou et al., 2020). Zato smo želeli preveriti, če se pri populaciji bolnikov, ki so bili vključeni v študijo in so zaradi okužbe umrli, pojavnost protiteles razlikuje od pojavnosti pri preživelih bolnikih. Slika 7 prikazuje pojavnost protiteles pri 177 bolnikih, ki so bili zajeti v študijo. Bolniki so razdeljeni na preživele (n = 144) in umrle (n = 33). Protitelesa so bila laboratorijsko prikazana pri 89,58 % preživelih bolnikov in pri 63,64 % umrlih bolnikov, ne pa tudi pri 10,42 % preživelih bolnikov in 36,36 % umrlih bolnikov. Statistično sta bili skupini primerjani s Fisherjevim eksaktnim testom. Izračunana je bila vrednost p, ki znaša 0,0007, kar pomeni, da so bila pri umrlih bolnikih statistično značilno protitelesa dokazana manj pogosto.



Slika 7: Pojavnost protiteles pri preživelih in umrlih bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

2.6.7 Čas pojavnosti protiteles pri bolnikih mlajših od 65 let in bolnikih starih 65 let in več, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

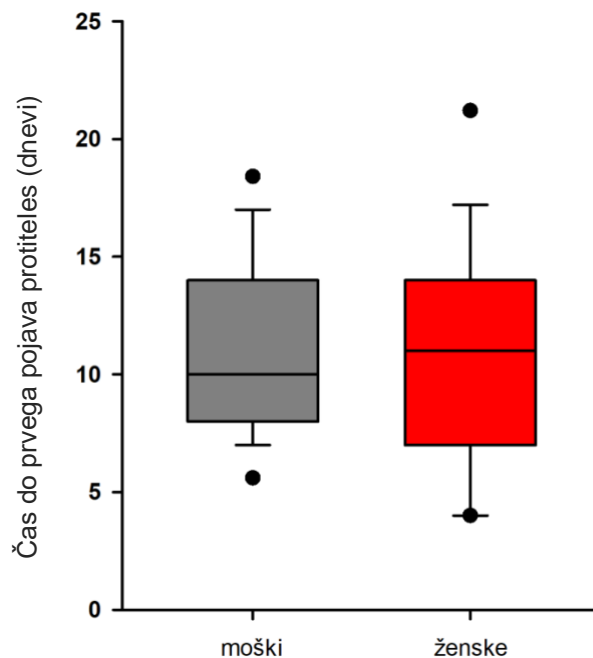
Na pojavnost protiteles glede na znanstveno literaturo vpliva tudi starost. Slika 8 prikazuje statistične značilnosti pojavnosti protiteles pri 40 bolnikih, mlajših od 65 let, in pri 88 bolnikih, starih 65 let in več, hospitaliziranih v Kliniki Golnik zaradi okužbe s SARS-CoV-2, ki so bili zajeti v študijo in pri katerih je bil beležen pojav protiteles. Povprečna starost prve skupine bolnikov je znašala 53 let, druge pa 79 let. Podatki so prikazani v obliki škatle z brki. Mediana časa pojavnosti protiteles za obe starostni skupini znaša deset dni. Polovici bolnikov, mlajših od 65 let, so se protitelesa razvila med približno devetimi in štirinajstimi dnevi. Polovici bolnikov, starih 65 let in več, so se protitelesa pojavila med približno sedmimi in trinajstimi dnevi. Četrtni bolnikov, mlajših od 65 let, so se protitelesa pojavila med približno sedmimi in devetimi dnevi in četrtni bolnikov, starih 65 let in več, so se protitelesa pojavila med približno štirimi in sedmimi dnevi. Četrtni bolnikov, mlajših od 65 let, so se protitelesa pojavila med približno štirinajstimi in sedemnajstimi dnevi. Četrtni bolnikov, starih 65 let in več, so se protitelesa pojavila med približno trinajstimi in šestnajstimi dnevi. Vrednost p testa Mann-Whitney znaša 0,2, kar pomeni, da med starostnima skupina ni statistično značilnih razlik.



Slika 8: Čas pojavnosti protiteles pri bolnikih mlajših od 65 let in bolnikih starih 65 let in več, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

2.6.8 Čas pojavnosti protiteles pri moških in ženskah, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

Na pojavnosti protiteles glede na znanstveno literaturo vpliva spol. Slika 9 prikazuje čas pojavnosti protiteles pri 71 moških in 57 ženskah, hospitaliziranih v Kliniki Golnik zaradi okužbe s SARS-CoV-2, ki so bili zajeti v študijo in pri katerih je bil beležen pojav protiteles. Podatki so prikazani v obliki škatle z brki. Mediana časa pojavnosti protiteles pri ženskah znaša deset dni in pri moških znaša deset dni. Polovici moških so se protitelesa pojavila med približno osmimi in štirinajstimi dnevi. Polovici žensk so se protitelesa pojavila med približno sedmimi in štirinajstimi dnevi. Četrtni moških so se protitelesa pojavila med približno sedmimi in osmimi dnevi. Četrtni žensk so se protitelesa pojavila med približno štirimi in sedmimi dnevi. Četrtni moških in četrtni žensk so se protitelesa pojavila med približno štirinajstimi in sedemnajstimi dnevi. Vrednost p testa Mann-Whitney znaša 0,53, kar pomeni, da med spoloma ni statistično značilnih razlik.



Slika 9: Čas pojavnosti protiteles pri moških in ženskah, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2.

2.6.9 Multipla linearna regresija za pojavnost protiteles pri vseh bolnikih, hospitaliziranih zaradi okužbe s SARS-CoV-2

Na razvoj protiteles vplivajo različne pridružene bolezni. Zanimalo nas je, če različne pridružene bolezni (Tabela 2) vplivajo na čas pojavnosti protiteles pri bolnikih, vključenih v našo študijo.

Tabela 2 prikazuje rezultate multiple linearne regresije za pojavnost protiteles tipov IgM ali IgG pri vseh 128 bolnikih, ki so bili zajeti v študijo in pri katerih je bil beležen pojav protiteles. Primerjava vključuje tudi starost in spol.

Neodvisna spremenljivka/prediktor	Vrednost kriterija	P-vrednost
Starost	-0,03	0,40
Spol (ž)	-0,16	0,85
AH	0,59	0,53
SB	0,13	0,89
HLP	0,44	0,70
Respiratorne bolezni	1,20	0,23
KVS bolezni	-1,49	0,14
Revma. bolezni in stanje imunokomp.	-1,79	0,54
Malignom	1,54	0,29
Renalne bolezni	-1,47	0,49
Ostalo	0,11	0,90

Tabela 2: Tabela multiple linearne regresije

Rezultati multiple linearne regresije

Čas nastanka protiteles se je v odvisnosti od starosti krajšal z vsakim letom starosti. Protitelesa so se z vsakim nadaljnjim letom starosti pojavila 0,03 dni prej. Vrednost p statističnega testa znaša 0,40, kar pomeni, da razlike niso statistično značilnega pomena. Rezultat podpira prejšnjo analizo.

Protitelesa so se pri ženskah pojavila v povprečju 0,16 dni prej kot pri moških. Vrednost p statističnega testa znaša 0,85, razlike niso statistično značilnega pomena. Rezultat podpira prejšnjo analizo.

Pridružene bolezni so bile razdeljene v skupine, in sicer so bile ločeno testirane arterijska hipertenzija (AH), sladkorna bolezen (SB), hiperlipidemija (HLP), respiratorne bolezni (astma, KOPB, idiopatska pljučna fibroza...), kardiovaskularne bolezni (ishemična bolezen srca, srčno popuščanje, hiperlipoproteinemija, periferna okluzivna arterijska bolezen, možganska kap, atrijska fibrilacija, srčne zaklopke, pljučna arterijska hipertenzija, ...) , revmatološke bolezni ter stanja imunokompromitiranosti, malignom, renalne bolezni in ostale bolezni.

Pri bolnikih z AH so protitelesa nastala v povprečju 0,59 dni kasneje kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,53, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih s SB so se protitelesa pojavila povprečno 0,13 dni kasneje, kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,89, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih s HLP so se protitelesa pojavila v povprečju 0,44 dni kasneje kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,70, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih z respiratornimi boleznimi so se protitelesa pojavila v povprečju 1,2 dni kasneje kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,23, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih s KVS boleznimi so se protitelesa pojavila v povprečju 1,49 dni prej kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,14, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih, ki so imunokompromitirani ali imajo pridružene revmatološke bolezni so se protitelesa pojavila v povprečju 1,79 dni prej, kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,54, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih z malignomom so se protitelesa v povprečju pojavila 1,54 dni kasneje. Vrednost p znaša 0,29, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih z renalnimi boleznimi so se protitelesa v povprečju pojavila 1,47 dni prej, kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,49, razlike niso statistično značilnega pomena. Pri bolnikih z drugimi pridruženimi boleznimi so se protitelesa pojavila v povprečju 0,11 dni kasneje kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,90, razlike niso statistično značilnega pomena. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med bolniki brez pridruženih boleznih in bolniki s pridruženimi boleznimi je bil izveden Studentov t-test. Vrednost p znaša 0,68, razlike niso statistično značilnega pomena.

Multipla linearna regresija je bila opravljena še za podskupino sledenih bolnikov. Statistično značilne razlike so bile opažene v podskupini sledenih bolnikov z malignomom, pri katerih je bil čas nastanka protiteles za 7,22 dni daljši, kot pri bolnikih brez pridruženih boleznih. Vrednost p znaša 0,017, vendar je potrebno upoštevati, da je bilo sledenih bolnikov le 55, od tega so imeli le štirje bolniki malignom.

Zaključek

Protitelesa igrajo pri obrambi organizma pred okužbami pomembno vlogo. Njihov čas nastanka pogojujejo razni dejavniki, med njimi tudi starost, spol in pridružene bolezni (Cuffari, 2021). Hipoteza raziskovalne naloge predpostavlja, da starost, spol in pridružene bolezni vplivajo na čas nastanka specifičnih protiteles pri okužbi s SARS-CoV-2. Pričakovano je bilo, da se bodo protitelesa pojavila hitreje pri bolnikih, mlajših od 65 let, ženskah ter pri bolnikih brez pridruženih bolezni.

Razen pri skupini bolnikov z maligno boleznijo, pri katerih smo beležili statistično značilno kasnejše nastajanje protiteles, statističnih razlik med različnimi populacijami bolnikov nismo zaznali. Statistično značilne razlike so se pojavile tudi med preživeli in umrli bolniki, in sicer so se protitelesa pogosteje pojavljala pri preživelih bolnikih. Ker so razlike statistično neznačilne, lahko zaključimo, starost, spol in pridružene bolezni v naši skupini bolnikov ne vplivajo na čas nastanka protiteles. Hipoteza je ovržena.

Rezultati raziskave se razlikujejo od pričakovanih. Temu bi lahko botrovalo več razlogov.

Ena od možnosti je sorazmerno majhna populacija v študijo vključenih bolnikov. Z vključitvijo več bolnikov bi se izboljšala statistična moč, kar bi omogočilo odkrivanje majhnih, vendar značilnih razlik. Dodatno bi lahko raziskavo izboljšali z daljšim opazovanjem bolnikov. Pri nekaterih bolnikih je bila kri namreč testirana samo enkrat, pri ca. 20 % pa nastanka protiteles laboratorijsko sploh ni bil zaznan.

Pomembna šibkost študije je tudi v sorazmerno majhnem številu sledenih bolnikov, torej bolnikov, pri katerih je bil lahko z gotovostjo ugotovili točen dan nastanka protiteles. Ker so bili upoštevani vsi bolniki, so podatki bolj razpršeni, s tem pa se je zmanjšala statistična moč študije.

Pomagalo bi tudi, če bi vzorce krvi na nastanek protiteles testirali pogosteje, npr. vsak dan namesto vsakih 2 – 3 dni.

Dodatno so rezultati lahko nekoliko manj nezanesljivi tudi zaradi subjektivnosti o začetku datuma simptomov, ki ga poda bolnik.

Viri

Ali, Z., & Bhaskar, S. B. 2016. Basic statistical tools in research and data analysis. *Indian journal of anaesthesia*, 60(9), 662–669. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.190623>

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic. (3. 3. 2021). Mayo Clinic. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/coronavirus/diagnosis-treatment/drc-20479976>

Cuffari, B. M. (4. 3. 2021). *What Factors Affect Antibody Production?* News-Medical.Net. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s <https://www.news-medical.net/health/What-Factors-Affect-Antibody-Production.aspx>

Delves, P. J., Roitt, I. M. (2000). *The Immune System*. *New England Journal of Medicine*, 343(1), 37–49. doi:10.1056/nejm200007063430107

Dolenc Koce, J., Zalar, P., Belušič, P., Vittori, M., Turk, M. (2018). *Biologija 2: O zgradbi in delovanju organizmov*. Ljubljana: Mladinska knjiga. Str. 226 – 234. ISBN 9789610150657

Gómez-Verjan, J.C., García-Peña, C., Rivero-Segura, N.A. When Chronic Diseases Meet Infectious Diseases: A Proposal Toward Healthy Aging: Lessons from COVID-19 Outbreak. 2020. *Preprints2020*, 2020050035

Gruver, A., Hudson, L., & Sempowski, G. (2007). Immunosenescence of ageing. *The Journal of Pathology*, 211(2), 144–156. doi:10.1002/path.2104

Koronavirus - pogosta vprašanja in odgovori | www.nijz.si. (b. d.). NIJZ. Pridobljeno: 9. 3. 2021, s <https://www.nijz.si/sl/koronavirus-pogosta-vprasanja-in-odgovori#ali-okuzene-osebe%2C-ki-so-brez-simptomov-in-znakov-bolezni%2C-lahko-prenasajo-okuzbo%3F>

LaMorte, W. (4. 6. 2016). *Non-Living Infectious Agents*. Boston University School of Public Health. Pridobljeno 12. 3. 2021 s: https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/ph/ph709_infectiousagents/PH709_InfectiousAgents8.html

Montecino-Rodriguez, E., Berent-Maoz, B., Dorshkind, K. (2013). Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *The Journal of clinical investigation*, 123(3), 958–965. doi:10.1172/JCI64096

NIAID Integrated Research Facility. (13. 2. 2020). *SARS-CoV-2 Under the Transmission Electron Microscope*. [Fotografija]. Pridobljeno: 9. 3. 2021 <https://www.microscopeworld.com/Images/COVID-19-TEM.jpg>

Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmunity Reviews*, 11(6–7), A479–A485. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.022>

Ouassou, H., Kharchoufa, L., Bouhrim, M., Daoudi, N. E., Imtara, H., Bencheikh, N., ELbouzidi, A., & Bnouham, M. (2020). The Pathogenesis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Evaluation and Prevention. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/1357983>

Parija, S. C. (b. d.). *Factors affecting production of antibodies*. BrainKart. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s http://www.brainkart.com/article/Factors-affecting-production-of-antibodies_17950/

Quantitative Research Methods. 2014. National Council for Osteopathic Research. Ruggieri, A., Anticoli, S., D'Ambrosio, A., Giordani, L., Viora, M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann Ist Super Sanita*. 2016 Apr-Jun;52(2):198-204. doi: 10.4415/ANN_16_02_11.

Trampuž, A., Rezar, L., Tomič, V., Muzlovič, I.(2003). SARS (hudi akutni respiratorni sindrom) - nov izziv za človeštvo. *Zdravniški vestnik, letnik 72, številka 7/8, str. 453-460*. URN:NBN:SI:DOC-K737BB4W. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s <http://www.dlib.si>

Understanding How COVID-19 Vaccines Work. (13. 1. 2021). Centers for Disease Control and Prevention. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/how-they-work.html>

Vozelj, M. (2000). *Temelji imunologije*. Ljubljana: DZS. ISBN 86-341-2863-6
Wanner, M. (2020). *IMMUNE SYSTEM CHANGES WITH AGE DIFFER BETWEEN MEN AND WOMEN*. The Jackson Laboratory. Pridobljeno: 9. 3. 2021 s <https://www.jax.org/news-and-insights/2020/february/immune-system-changes-with-age-differ-between-men-and-women>