

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: doktorský

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Mária Magicová

**Aspekty imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny po infekci virem
SARS-CoV-2**

Aspects of immune response in kidney transplant recipients after SARS-CoV-2 infection

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17. 3. 2024

Mária Magicová

Podpis

Identifikační záznam:

MAGICOVÁ, Mária. *Aspekty imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny po infekci virem SARS-CoV-2. [Aspects of immune response in kidney transplant recipients after SARS-CoV-2 infection]*. Praha, 2024. 121s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie IKEM. Školitel prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc. za příležitost podílet se na tomto projektu, za umožnění neustálého vzdělávání se a za jeho pomoc, cenný čas a podporu při vedení mé disertační práce.

Děkuji týmu prof. MUDr. Ilji Stříže, CSc. z Oddělení klinické imunologie IKEM, zejména Mgr. Martině Fialové za její práci na metodických postupech, analýze imunitní odpovědi a pomoc s interpretací těchto dat.

Poděkování patří mým kolegům a přátelům, jmenovitě MUDr. Ivanovi Zahradkovi za spolupráci na všech uvedených projektech, dále MUDr. Vojtěchovi Petrovi za spolupráci na projektu „Efektivita mRNA vakcín proti SARS-CoV-2 v prevenci infekce u pacientů po transplantaci ledviny“ a MUDr. Michalovi Schmalzovi, MUDr. Silvii Rajnochové Bloudíčkové, Ph.D., DBA a MUDr. Haně Vaňkové, Ph.D. za spolupráci na projektu „Vliv frailty syndromu na protilátkovou odpověď po očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2 u pacientů vyššího věku po transplantaci ledviny“. Dále bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Petře Hrubé, Ph.D. a Ing. Istvánovi Módosovi, Ph.D. za statistickou analýzu na těchto dvou projektech. Díky patří také kolektivu Odboru informatiky IKEM za spolupráci na sběru dat.

Chtěla bych také poděkovat celému týmu Kliniky nefrologie TC IKEM, zejména Transplantační ambulance, všem sestřičkám a koordinátorkám za administrativní pomoc, sběr biologického materiálu a klinických dat a v neposlední řadě všem pacientům, bez kterých by tyto projekty nemohly být realizovány.

Naše práce vznikly za podpory grantů MZČR NV19-06-00031, NU21-06-00021, NU22-C-126 a IKEM IN 00023001.

Velké poděkování ovšem patří celé mé rodině a zejména mému manželovi Matúšovi za vytvoření podmínek pro práci, jejich neustálou podporu a trpělivost.

Obsah

Použité zkratky	7
Abstrakt	10
Abstract	11
1. Úvod	12
2. Přehled problematiky	14
2.1 Koronaviry a závažná onemocnění jimi způsobená.....	14
2.2 Genom a struktura SARS-CoV-2.....	15
2.3 Patogeneze infekce virem SARS-CoV-2	15
2.3.1 Životní cyklus viru.....	15
2.3.2 Mutace a varianty SARS-CoV-2	18
2.3.3 Přenos viru a orgánový tropismus.....	19
2.3.4 Mechanismy vrozené imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2.....	21
2.3.5 Adaptivní imunita a SARS-CoV-2	24
2.3.6 Role imunitního systému v rozvoji závažného průběhu covidu-19 a postcovidového syndromu	27
2.4 Imunitní aspekty pacientů po transplantaci ledviny v souvislosti s covidem-19.....	29
2.4.1 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci SARS-CoV-2	29
2.4.2 Vakcíny proti SARS-CoV-2	32
2.4.3 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na očkování proti SARS-CoV-2	32
2.4.4 Efektivita vakcín	36
2.5 Léčba covidu-19	37
2.6 Diagnostika infekce SARS-CoV-2	39
2.7 Testování protilátkové a buněčné imunitní odpovědi.....	39
3. Hypotéza	41
4. Cíle práce	41
5. Metodika	42
5.1 Populace	42
5.2 Analýza humorální imunity	42
5.3 Analýza buněčné imunity.....	42
5.4 Statistická analýza.....	43

6. Publikované výsledky vztahující se k tématu disertační práce	44
6.1 Protilátková odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci SARS-CoV-2....	44
6.1.1 Úvod.....	44
6.1.2 Metodika	44
6.1.3 Výsledky	44
6.1.4 Diskuse.....	46
6.2 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2.....	59
6.2.1 Úvod.....	59
6.2.2 Metodika	59
6.2.3 Výsledky	59
6.2.4 Diskuse.....	62
6.3 Vliv frailty syndromu na protilátkovou odpověď po očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2 u pacientů vyššího věku po transplantaci ledviny.....	77
6.3.1 Úvod.....	77
6.3.2 Metodika	77
6.3.3 Výsledky	77
6.3.4 Diskuse.....	78
6.4 Efektivita mRNA vakcín proti SARS-CoV-2 v prevenci infekce u pacientů po transplantaci ledviny	88
6.4.1 Úvod.....	88
6.4.2 Metodika	88
6.4.3 Výsledky	89
6.4.4 Diskuse.....	89
7. Diskuse	102
8. Závěry	105
9. Souhrn	107
10. Summary	108
Seznam použité literatury	109
Publikace	120

Použité zkratky

μg, mikrogram

μl, mikrolitr

ACE2, angiotenzin-konvertující enzym 2 (angiotensin-converting enzyme 2)

ADCC, na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (antibody-dependent cellular cytotoxicity)

ADCP, na protilátkách závislá buněčná fagocytóza (antibody-dependent cellular phagocytosis)

AKI, akutní poškození ledvin (acute kidney injury)

APOL1, apolipoprotein L1

ARDS, syndrom akutní dechové tísně (acute respiratory distress syndrome)

AU, arbritární jednotka (arbitrary unit)

BMI, index tělesné hmotnosti (body mass index)

CD, cluster of differentiation

CD4-CTL, CD4+ cytotoxické T-lymfocyty

CDC, komplement-dependentní cytotoxicita (complement-dependent cytotoxicity)

CI, interval spolehlivosti (confidence interval)

CLIA, chemiluminiscenční imunoanalýza (chemiluminescent immunoassay)

CNI, inhibitor kalcineurinu (calcineurin inhibitor)

COVAN, nefropatie asociovaná s covidem-19 (covid-19 associated nephropathy)

Covid-19, coronavirus disease 2019

Ct, cycle treshold

DAMP, damage-associated molecular patterns

DMV, double-membrane vesicle

DNA, deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dsRNA, dvouvláknová ribonukleová kyselina (double-stranded ribonucleic acid)

eGFR, odhadovaná glomerulární filtrace (estimated glomerular filtration rate)

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

FcγR, receptor pro Fc fragment imunoglobulinu

FOXP3, forkhead box protein P3

HCoV, lidský koronavirus (human coronavirus)

HIF, transkripční faktor indukovaný hypoxií (hypoxia-inducible factor)

IFA, indirect immunofluorescence assay

IFN, interferon

Ig, imunoglobulin
IGRA, interferon- γ release assay
IL, interleukin
IQR, mezikvartilové rozpětí (interquartile range)
IR, míra incidence (incidence rate)
IRR, poměr míry incidence (incidence rate ratio)
ISGs, geny stimulované interferonem (interferon-stimulated genes)
IU, mezinárodní jednotka (international unit)
JAK/STAT, janus kinase/signal transducers and activators of transcription
kb, kilobáze
LFIA, lateral flow immunoassay
LGP2, laboratory of genetics and physiology 2
MDA5, melanoma differentiation-associated protein 5
MERS-CoV, blízkoovýchodní respirační syndrom (Middle East respiratory syndrome coronavirus)
min, minuta
ml, mililitr
MMF, mykofenolát mofetil
mRNA, messenger ribonucleic acid
mTOR, mammalian target of rapamycin
NAAT, amplifikační testy nukleové kyseliny (nucleic acid amplification test)
ng, nanogram
NK buňky, natural killer cells
NLRP3, nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3
NLRs, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
nsp, nestrukturální protein (non-structural protein)
OR, poměr šancí (odds ratio)
ORF, open reading frame
PAMP, pathogen-associated molecular patterns
PCR, polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
protein E, obalový (envelope)
protein M, membránový (membrane)

protein N, nukleokapsidový (nucleocapsid)

protein S, spike

PRRs, pattern recognition receptors

RBD, receptorová vazebná doména (receptor-binding domain)

RIG-I, retinoic acid-inducible gene-I

RLRs, retinoic acid-inducible gene-I-like receptors

RNA, ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute 1640

S1, podjednotka S1 spike proteinu

S2, podjednotka S2 spike proteinu

S2', oblast podjednotky S2 spike proteinu

SARS-CoV, závažný akutní respirační syndrom způsobený koronavirem (severe acute respiratory syndrome coronavirus)

SARS-CoV-2, závažný akutní respirační syndrom způsobený koronavirem 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

ssRNA, jednovláknová ribonukleová kyselina (single-stranded ribonucleic acid)

Tfh, folikulární pomocné T-lymfocyty (T follicular helper cells)

Th, pomocné T-lymfocyty (T helper cells)

TLRs, toll-like receptors

TMPRSS2, transmembránová serinová proteáza 2 (transmembrane serine protease 2)

TNF, tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

ÚZIS, Ústav zdravotnických informací a statistiky

VOCs, variants of concern

Abstrakt

Pacienti po transplantaci ledviny jsou jednou z nejohroženějších skupin z hlediska úmrtí na covid-19 a vzhledem k vysoké mortalitě ve srovnání s obecnou populací je potřebné rozšířit současné poznatky týkající se imunitní odpovědi jak po přirozené infekci virem SARS-CoV-2, tak po vakcinaci. Cílem této práce je analýza faktorů ovlivňujících postinfekční a postvakcinační imunitní odpověď u pacientů po transplantaci ledviny, identifikace jedinců v nejvyšším riziku onemocnění a stanovení míry ochrany, kterou vakcíny proti SARS-CoV-2 těmto pacientům poskytují. Měřením IgG protilátek proti spike proteinu jsme u pacientů po transplantaci ledviny prokázali zachovanou humorální odpověď po infekci virem SARS-CoV-2 srovnatelnou s obecnou populací, která je navíc závislá na závažnosti průběhu samotného onemocnění. Analýzou postvakcinační imunity se u virus-naivních pacientů očkovaných po transplantaci potvrdila výrazně snížená humorální odpověď. Naopak u jedinců, kteří v minulosti prodělali covid-19, byla protilátková odpověď po vakcinaci robustní. Další skupinou pacientů se zachovanou humorální odpovědí byli pacienti očkovaní na čekací listině. Nejvýznamnějšími faktory negativně ovlivňujícími tvorbu protilátek po vakcinaci byly imunosupresivní léčba mykofenolát mofetilem, podání depleční léčby v posledním roce před očkovaním, vyšší věk pacientů a syndrom frailty neboli syndrom geriatrické křehkosti. Nakonec jsme prokázali, že i přes sníženou postvakcinační imunitní odpověď bylo očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 asociováno se snížením výskytu infekce, proto by mělo být základní součástí preventivních opatření a nabízeno všem pacientům.

Klíčová slova

SARS-CoV-2, covid-19, transplantace ledviny, imunitní odpověď, protilátky, mRNA vakcíny, efektivita

Abstract

Kidney transplant recipients are one of the most at-risk populations in terms of covid-19-related death. Because of much higher mortality among these patients compared to the general population, it is necessary to expand the current knowledge concerning the immune response to natural SARS-CoV-2 infection as well as covid-19 vaccines. The aim of the study is to analyze factors affecting immunity after infection and vaccination in kidney transplant recipients, to identify individuals at the highest risk of the disease and determine the degree of protection that SARS-CoV-2 vaccines offer to these patients. By measuring IgG antibodies against the spike protein we confirmed preserved humoral response to SARS-CoV-2 infection similar to the general population, which is also dependent on the course of covid-19. Analysis of post-vaccination immune response revealed a significantly reduced humoral response among virus-naïve kidney transplant recipients. On the contrary, a robust antibody response following vaccination was observed in individuals with a history of covid-19. Another group of patients with well-preserved humoral response were those vaccinated while on the waiting list. Immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil, treatment with depleting agents during the last year, older age and frailty syndrome were among the most significant factors negatively associated with antibody production following vaccination. Finally, we confirmed, that despite a reduced post-vaccination immune response, two doses of mRNA vaccines against SARS-CoV-2 were associated with lower infection rates and therefore should be an essential part of preventive measures and offered to all patients.

Key words

SARS-CoV-2, covid-19, kidney transplantation, immune response, antibodies, mRNA vaccines, effectiveness

1. Úvod

Pandemie covidu-19 silně zasáhla populaci pacientů po transplantaci ledviny a přinesla celou řadu výzev pro zdravotnické systémy, které o tyto pacienty pečují. Ukázalo se, že pacienti po transplantaci solidních orgánů a pacienti v terminálním stadiu onemocnění ledvin jsou oproti pacientům s jinými chronickými nemocemi v nejvyšším riziku úmrtí na covid-19. Významným rizikovým faktorem je rovněž vyšší věk, přičemž lidé ve věku nad 70 let tvoří nejohroženější kohortu (Williamson E. J. et al., 2020) a tito jedinci představují nezanedbatelné procento pacientů po transplantaci ledviny. Pochopení aspektů imunitní odpovědi na infekci virem SARS-CoV-2 a vakcinaci proti SARS-CoV-2 v populaci pacientů po transplantaci ledviny je klíčové, proto se tato problematika stala tématem této disertační práce.

Ve srovnání s obecnou populací je časná mortalita pacientů po transplantaci ledviny na covid-19 velmi vysoká (28 % vs. 1–5 %) (Akalin E. et al., 2020). Z tohoto důvodu se u této populace předpokládá oslabená imunitní odpověď na SARS-CoV-2 infekci, podobně jako je popisováno v případě infekce virem chřipky (Hirzel C. et al., 2019). Navíc na základě studií prokazujících oslabenou imunitní odpověď po očkování proti viru chřipky v transplantované populaci (Baluch A. et al., 2013) lze také předpokládat slabší imunogenicitu vakcín proti SARS-CoV-2. Je proto důležité porozumět příčinám horší imunitní odpovědi po očkování a identifikovat jedince v nejvyšším riziku nákazy a závažného průběhu covidu-19. K posouzení skutečné míry ochrany vakcín, kterou pacientům po transplantaci ledviny poskytují, je nezbytné stanovení efektivity vakcín.

První část práce se věnuje všeobecnému popisu problematiky. Shrnuje nejen základní charakteristiky viru SARS-CoV-2 a jeho variant, ale i koronavirů obecně, dále patogenezi infekce včetně popisu virového cyklu a poznatky o orgánovém tropismu viru. Velká část přehledu problematiky je pro ozřejmení rozdílů mezi pacienty po transplantaci ledviny zaměřena na imunitní odpověď po přirozené infekci v obecné populaci a na roli imunitního systému v patogenezi závažného covidu-19, ke kterému imunosuprimovaná populace predisponuje. Dále se text zaměřuje na transplantovanou populaci, kde shrnuje poznatky o postvakcinační odpovědi a efektivitě vakcín proti SARS-CoV-2. V neposlední řadě jsou pro ucelený přehled v krátkosti uvedeny současné možnosti léčby covidu-19 s ohledem na populaci v nejvyšším riziku progresu do závažného onemocnění, možnosti diagnostiky infekce SARS-CoV-2 a testování adaptivní imunity.

V další části práce jsou definovány cíle a hypotéza, na které navazují čtyři původní práce, které jsou podkladem disertace s popisem použitých metod a výsledků diskutovaných *in extenso* v rámci jednotlivých kapitol.

Závěrečná diskuse shrnuje zásadní dosažené výsledky s ohledem na definovanou hypotézu a cíle.

2. Přehled problematiky

2.1 Koronaviry a závažná onemocnění jimi způsobená

Koronaviry jsou obalené viry s jednovláknovou RNA patřící do čeledi *Coronaviridae* z řádu *Nidovirales*, rozlišující se dále na 4 rody: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamma-coronavirus* a *Deltacoronavirus*. Jejich název je odvozen od latinského slova „corona“, neboť rozložením povrchových proteinů připomínají v elektronovém mikroskopu korunu. Z této široce rozšířené skupiny virů je známo 7 koronavirů schopných infikovat člověka. Čtyři z nich (alfakoronaviry HCoV-229E a HCoV-NL63 a betakoronaviry HCoV-OC43 a HCoV-HKU1) způsobují u lidí běžné nachlazení a onemocnění vykazuje sezónní charakter. Do popředí zájmu se koronaviry dostaly zejména v posledních dvaceti letech, kdy došlo k objevu tří nových koronavirů, betakoronavirů SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus), MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) a SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Tyto viry jsou původci mnohem závažnějších onemocnění, která mohou vyústit až do respiračního selhání (Vukovski P. et al., 2021).

Nejrozsáhlejší a nejzávažnější dopad dosud měl koronavirus SARS-CoV-2 způsobující onemocnění covid-19 (coronavirus disease 2019). Přesný původ SARS-CoV-2 zatím nebyl objasněn, předpokládá se jeho rozšíření ze zvířecích rezervoárů, nejpravděpodobněji z vrápenců (*Rhinolophus*) (Temmam S. et al., 2022). První případ infekce SARS-CoV-2 byl identifikován v prosinci roku 2019 v čínském městě Wu-chan (Zhu N. et al., 2020) a velmi rychle se nákaza rozšířila do celého světa. Dodnes (únor 2024) bylo celosvětově evidováno přes 774 milionů případů infekce a více než 7 milionů úmrtí na onemocnění covid-19. V České republice, jako jedné z nejvíce postižených zemí, bylo potvrzeno více než 4,7 milionů případů nákazy a onemocnění podlehl více než 43 tisíc nemocných (World Health Organization, 2024).

Covid-19 je onemocnění se širokým klinickým spektrem postihující dominantně respirační systém ale i různé jiné orgánové soustavy s možnými dlouhodobými následky. Nejčastěji probíhá onemocnění mírně nebo středně závažně s příznaky postižení dolních dýchacích cest, ale bez známek hypoxémie. Neobvyklý není ani asymptomatický průběh, na druhou stranu však může dojít k rozvinutí závažného stavu se systémovou inflamací, respiračním selháním a rozvojem syndromu akutní dechové tísně (ARDS) (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024, Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022).

2.2 Genom a struktura SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je obalený virus s jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou. Genom SARS-CoV-2 je jeden z největších z RNA virů velikosti kolem 30 kb (Kim D. et al., 2020), kódující celkem 29 proteinů. Geny pro nestrukturální proteiny na 5' konci RNA představují asi dvě třetiny genomu SARS-CoV-2 a vytvářejí replikační a transkripční komplex. Na 3' konci virové RNA se nacházejí geny kódující 4 strukturální proteiny – spike (S), obalový (E), membránový (M) a nukleokapsidový protein (N), které se podílejí na tvorbě virionu. Proteiny S, E a M jsou integrální membránové proteiny. Jediným strukturálním proteinem nacházejícím se uvnitř virionu je nukleokapsidový protein N, jenž tvoří obal virové RNA. Mezi těmito strukturálními geny leží geny pro akcesorní proteiny (Yang H., Rao Z., 2021). Většina akcesorních, nestrukturálních a strukturálních proteinů je navíc schopna interferovat s mechanismy vrozené imunity hostitele (Minkoff J. M., tenOever B., 2023). Klíčovým v patogenezi infekce je protein S, jelikož vazbou na cílový receptor determinuje virový tropismus. Je rovněž cílem neutralizačních protilátek (Piccoli L. et al., 2020).

2.3 Patogeneze infekce virem SARS-CoV-2

2.3.1 Životní cyklus viru

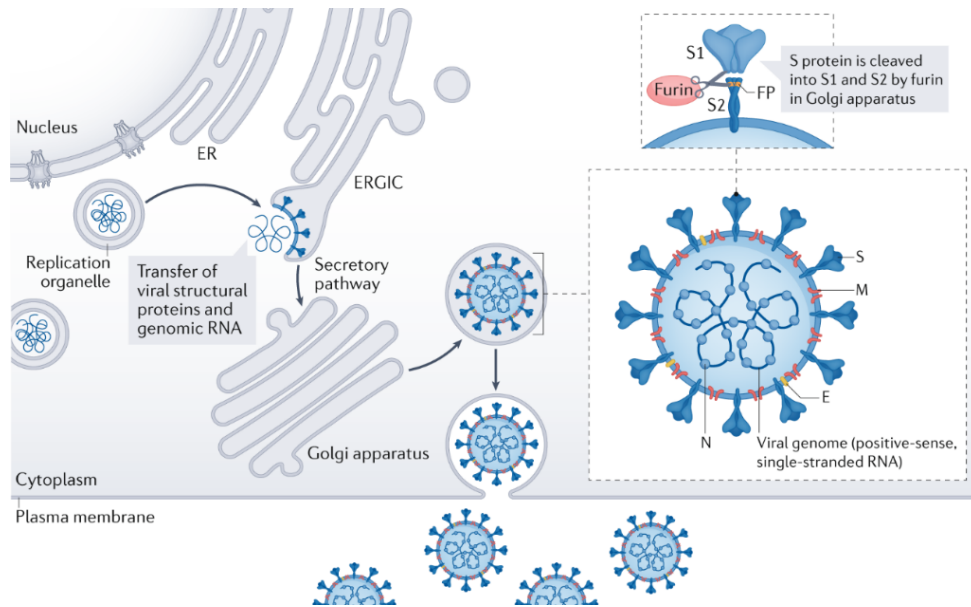
Předpokladem vstupu SARS-CoV-2 do hostitelské buňky je exprese cílového receptoru. Tím je angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2) (Zhou P. et al., 2020), který je fyziologicky součástí renin-angiotenzin-aldosteronového systému a je široce distribuován v lidských tkáních. Důležitou roli v patogenezi infekce hraje virový spike (S) protein. S protein je tvořen dvěma podjednotkami; S1 podjednotka se váže v místě receptorové vazebné domény (RBD) na ACE2 receptor a prostřednictvím S2 podjednotky dochází k fúzi viru s hostitelskou membránou (Walls A. C. et al., 2020).

Vstup viru do buněk nezávisí jenom na přítomnosti ACE2 receptoru, ale také na expresi buněčných proteáz aktivujících spike protein. Vazba podjednotky S1 na ACE2 receptor vede k odhalení S2 podjednotky v blízkosti fúzního peptidu v tzv. S2' oblasti. Tato oblast je štěpena buněčnou proteázou, aby prostřednictvím fúzního peptidu mohlo dojít ke spojení viru s hostitelskou membránou (Jackson C. B. et al., 2022). Hlavními buněčnými proteázami jsou povrchová transmembránová serinová proteáza 2 (TMPRSS2) (Hoffmann M. et al., 2020) a endolyzozomální cysteinový katepsin L. Podle toho se rozlišují dva mechanismy, kterými SARS-CoV-2 vstupuje do buněk. Častější je přímá fúze viru s cílovou buňkou, které předchází rozštěpení S2' oblasti proteázou TMPRSS2 na povrchu buňky. Alternativně vstupuje virus do

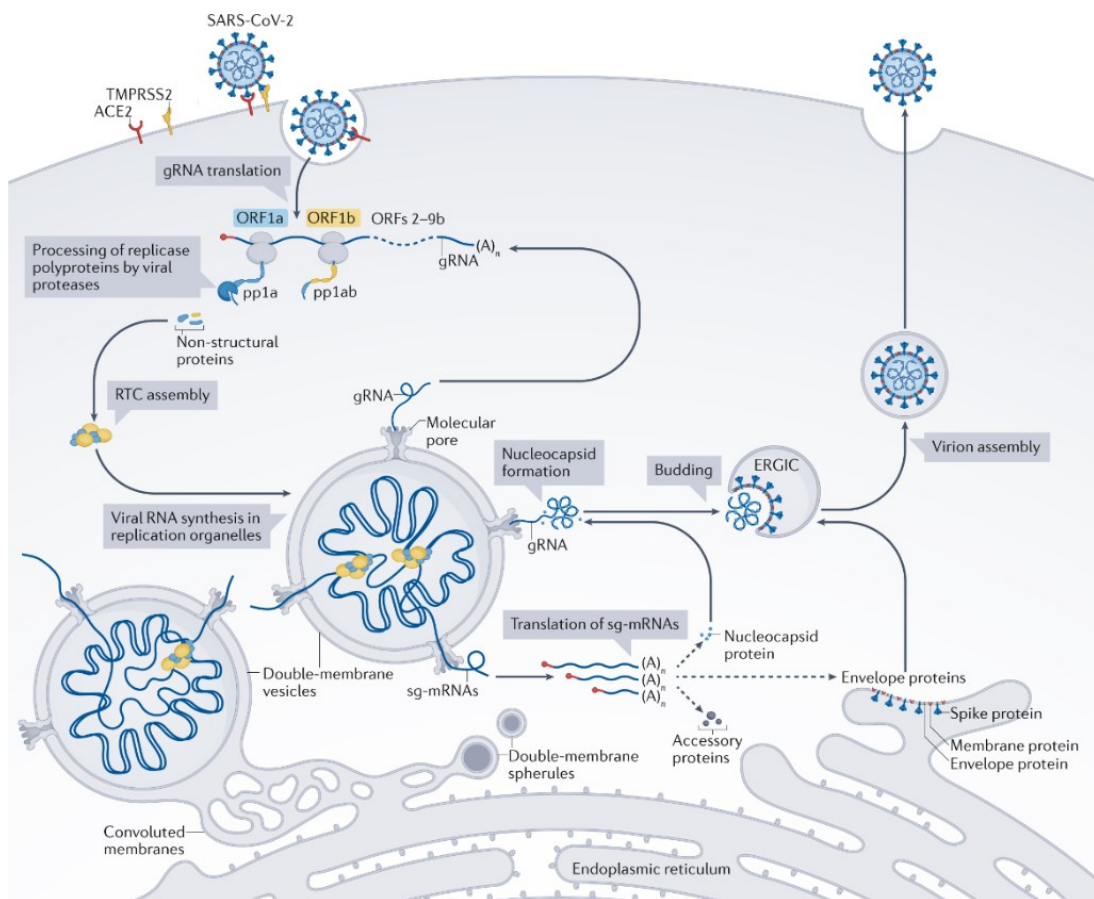
buňky prostřednictvím endocytózy, kdy je S2' oblast štěpena až v endolysosomu katepsinem. Tento mechanismus umožňuje vstup viru i do těch buněk, které TMPRSS2 neexprimují, případně ve velmi omezené míře (Jackson C. B. et al., 2022). Na usnadnění infekce by se mohly podílet i jiné hostitelské proteiny, navíc byl identifikován alternativní receptor pro virus SARS-CoV-2 nezávislý na expresi ACE2 (Baggen J. et al., 2023).

Po internalizaci virionu s buňkou dochází k uvolnění virové RNA do cytoplazmy a okamžité translaci na dva velké polyproteiny (pp1a, pp1ab), které jsou virovými proteázami štěpeny na nestrukturální proteiny (obr. 1). Ty se podílejí na vytvoření replikačně-transkripčního komplexu, který produkuje replikační meziprodukty opačné polarity (-ssRNA, dsRNA) s následným vznikem genomické (+ssRNA) a subgenomické RNA. Virové replikační meziprodukty (-ssRNA, dsRNA) jsou kompartmentalizovány v replikačních organelách, konkrétně v membránových veziklích (double-membrane vesicles, DMVs) (Klein S. et al., 2020) vznikajících z membrán endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Tímto jsou chráněny před rozpoznáním hostitelskými senzory uplatňujícími se ve vrozené imunitní odpovědi, jak bude dále uvedeno. Translaci subgenomické RNA vznikají akcesorní a strukturní proteiny (S, M, E, N) a pouze tyto čtyři proteiny jsou inkorporovány do virionu. Nově vytvořené proteiny S, M a E se spojují s virovým genomem obaleným N proteinem v intermediárním kompartmentu endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, kde jsou vzniklé viriony obaleny do vezikul (V'kovski P. et al., 2021, Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022, Minkoff J. M., tenOever B., 2023). Kompletní viriony jsou následně po fúzi s hostitelskou membránou uvolněny exocytózou do extracelulárního prostoru (Klein S. et al., 2020).

Důležitým procesem, který nastává ještě při syntéze virionu v infikovaných buňkách, je proteolytické štěpení spike proteinu v S1/S2 oblasti tvořené argininovými zbytky. K tomu dochází prostřednictvím furinu, proprotein konvertázy, v Golgiho aparátu (obr. 2). Toto proteolytické „předštěpení“ S1/S2 oblasti furinem v infikovaných buňkách je předpokladem pro druhé proteolytické štěpení S2' oblasti proteázami cílových buněk. Podjednotky S1 a S2 tak zůstávají spojeny nekovalentní vazbou, která činí spike protein méně stabilním, ale současně usnadňuje vstup SARS-CoV-2 do dalších cílových buněk při novém virovém cyklu (Hoffmann M. et al., 2020, Shang J. et al., 2020, Jackson C. B. et al., 2022).



Obr. 1 Infekční cyklus SARS-CoV-2 (Malone B. et al., 2022).



Obr. 2 Maturace virionu a štěpení spike proteinu furinem na podjednotky S1 a S2 (Jackson C. B. et al., 2022).

2.3.2 Mutace a varianty SARS-CoV-2

Během virové replikace dochází zcela přirozeně k náhodným mutacím. Ve větší míře vznikají mutace u RNA virů než u DNA virů (Sanjuán R., Domingo-Calap P., 2016) patrně v důsledku absence opravných mechanismů. Naprosté většině RNA virů totiž chybí 3'→5' exonukleázová korekční „proofreading“ aktivita (Steinhauer D. A., 1992), proto jsou RNA replikázy náchylnější k chybám vzniklým během virové replikace. Výjimkou jsou koronaviry, u kterých byla potvrzena exonukleázová aktivita asociovaná s nestrukturálním proteinem 14 (Minskaia E. et al., 2006). Z tohoto důvodu mají koronaviry také jeden z největších genomů z RNA virů (Sievers B. L. et al., 2024). Většina vzniklých mutací je nevýhodná pro samotný virus, proto dochází k jejich negativní selekci (Grubaugh N. D. et al., 2020). Nahromaděním několika mutací vznikají nové varianty viru a klinický dopad má pak selekce těch, které jsou pro virus výhodné stran zvýšené přenositelnosti, antigenicity či imunitního úniku. Následkem toho může u některých variant dojít k ovlivnění senzitivity diagnostických testů, efektivity antivirové léčby a vakcín, ke zvýšené vnímavosti k infekci, případně k závažnějšímu průběhu onemocnění.

Od propuknutí pandemie covidu-19 bylo identifikováno několik klinicky významných variant, tzv. variant vzbuzujících obavy (variants of concern, VOCs) – *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*, *Omicron*. U všech zmíněných variant je přítomna mutace spike proteinu. Pozitivní selekcí prošla mutace D614G, jedna z prvních známých mutací, která zůstala zachována během pandemie covidu-19 napříč všemi výše zmíněnými variantami. Tato mutace kompenzuje nestabilitu spike proteinu zesílením vazby mezi S1 a S2 podjednotkou, která vzniká proteolytickým štěpením v infikovaných buňkách (Jackson C. B. et al., 2022, Chakraborty C. et al., 2023).

Infekce těmito variantami je spojena s různým klinickým průběhem covidu-19. V metaanalýze 13 studií zahrnujících varianty *Alpha*, *Beta*, *Delta* a *Omicron* byla s největší klinickou závažností spojena varianta *Delta*, a to ve všech sledovaných kategoriích (riziko hospitalizace včetně hospitalizace na jednotkách intenzivní péče, mortality a hospitalizační mortality). Naopak nejméně závažný průběh nemoci byl pozorován u varianty *Omicron* (BA.1) (Yuan Z. et al., 2023).

Mutace a vznik nových variant ovlivňuje i efektivitu vakcín. Limitovaná účinnost vakcín byla ve srovnání s jinými variantami dokumentována zejména u varianty *Omicron* (Wu N. et al., 2023). Jde o variantu s největším počtem mutací v S proteinu včetně RBD domény a vůbec v celém genomu (Tian D. et al., 2022).

S narůstajícím počtem očkovaných jedinců nebo jedinců po prodělané infekci dochází k pozitivní selekci mutací S proteinu, které způsobují imunitní únik před neutralizačními protilátkami (Jackson C. B. et al., 2022, Guo L. et al., 2022), což spolu s nižší efektivitou vakcín v rámci některých variant může vyvolávat obavy. Na druhou stranu se oproti monoklonálním protilátkám může účinek polyklonálních protilátek lidského séra vzájemně doplňovat vzhledem k většímu množství epitopů S proteinu, proti kterým cílí (Li Q. et al., 2020). Podobně SARS-CoV-2 specifické T-lymfocyty jsou namířeny proti velkému množství epitopů (Tarke A. et al., 2021, Dan J. M. et al., 2021), a ačkoliv i jednobodová mutace může narušit odpověď T-buněk (Moss P., 2022), vznik variant, které by kompletně unikly imunitní odpovědi, je málo pravděpodobný (Sette A., Crotty S., 2021).

2.3.3 Přenos viru a orgánový tropismus

Covid-19 je vysoce nakažlivé onemocnění s mediánem inkubační doby 5 dní (Lauer S. A. et al., 2020) a k přenosu nákazy dochází třemi způsoby: kapénkovým přenosem, aerosolem nebo přímým kontaktem s infikovanou osobou (European Centre for Disease Prevention and Control, 2023). Virus SARS-CoV-2 je schopen infikovat různé orgány. Jeho tropismus je podmíněn koexpresí cílového receptoru ACE2 a proteáz hostitelských buněk usnadňujících vstup viru do buněk, zejména povrchové transmembránové serinové proteázy 2 (TMPRSS2) (Hoffmann M. et al., 2020, Jackson C. B. et al., 2022). Společná exprese genů pro TMPRSS2 a ACE2 byla potvrzena v buňkách respiračního a gastrointestinálního traktu, v rohovce, trombocytech a v nervových buňkách (Sungnak W. et al., 2020, Zhang S. et al., 2020, Matschke J. et al., 2020). Existují však i mechanismy na ACE2 receptoru nezávislé. Ukázalo se, že SARS-CoV-2 je schopen infikovat monocyty a makrofágy, které ACE2 neexprimují, případně jen minimálně, a vstup do těchto buněk je závislý na receptorech FcγR prostřednictvím protilátek navázaných na virus (Junqueira C. et al., 2022).

Primárním místem infekce jsou buňky řasinkového epitelu nosní dutiny, ve kterých je současně i nejvyšší exprese ACE2 receptorů v rámci respirační soustavy a distálním směrem jeho exprese klesá (Hou Y. J. et al., 2020). V případě, že mechanismy vrozené nebo adaptivní imunity nedojde k eliminaci viru, může se dostat inhalací nebo postupným šířením po tracheobronchiálním stromu až do plicních alveol (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022). Cílovými epitelovými buňkami v alveolech jsou zejména ACE2 exprimující pneumocyty II. typu (Hou Y. J. et al., 2020), jež produkují surfaktant a podílejí se na regeneraci alveolární výstelky. V případě progresu onemocnění může plicní postižení vyústit až do respiračního

selhání. Ačkoliv je virový tropismus k plicní tkáni zřejmý a přítomnost virové RNA ve vzorcích plic osob zemřelých v souvislosti s covidem-19 (Hanley B. et al., 2020) to potvrzují, na rozvoji syndromu akutní dechové tísně (ARDS) se podílí zejména dysfunkce imunitního systému (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022).

Přestože je covid-19 nemoc s dominantně respiračními symptomy, je postižení trávicího traktu častým extrapulmonálním projevem. O přímé infekci intestinální tkáně svědčí nejen přítomnost virové RNA ve stolici s poměrně vysokou frekvencí až 53 %, ale také průkaz nukleokapsidy v cytoplazmě žláznových epiteliálních buněk žaludku, duodena a rekta (Xiao F. et al., 2020). Mimo respirační a gastrointestinální trakt byla přítomnost virové RNA a subgenomické virové RNA, jako průkazu aktivní replikace viru, prokázána v pitevnických vzorcích srdce, jater, mozku a ledvin (Puelles V. G. et al., 2020, Hanley B. et al., 2020).

Ledviny jsou často postiženým orgánem u pacientů s onemocněním covid-19. Využitím mikrodisekce byl SARS-CoV-2 detekován ve všech definovaných ledvinných kompartmentech (tubulointerstitium, kůra, dřeň, glomeruly) (Puelles V. G. et al., 2020). Pacienti s infekcí SARS-CoV-2 a současným akutním poškozením ledvin (AKI) mají v moči vyšší virovou nálož oproti pacientům bez AKI (Caceres P. S. et al., 2021). Braun et al. navíc prokázal infekčnost viru po jeho izolaci z post mortem ledvinných vzorků (Braun F. et al., 2020). Přesto není zcela znám mechanismus a podíl přímého virového působení na renální dysfunkci. Časté postižení ledvin v souvislosti s covidem-19 je však nepochybně multifaktoriální a v patogenezi se mohou uplatňovat různé prerenální příčiny vedoucí k renální ischemii, vliv nefrotoxické léčby a další. Vazbou na cílové ACE2 receptory může dojít k dysregulaci renin-angiotenzin-aldosteronového systému a k endoteliálnímu poškození kromě přímé infekce virem přispívá i vliv prozánětlivých cytokinů a tromboinflamace (Varga Z. et al., 2020, Gupta A. et al., 2020). O důležité roli imunitní odpovědi hostitele v orgánovém postižení může svědčit absence virových částic či virové RNA v bioptických vzorcích ledvin osob s covidem-19 asociovanou nefropatií (COVAN), nově definovanou jednotkou v souvislosti s pandemií. Jde o raritní kolabující glomerulopatii vyskytující se u pacientů afrického etnika s rizikovou variantou v genu APOL1, která se klinicky projevuje akutním poškozením ledvin s nefrotickou proteinurií. Rozvoj COVAN je tedy u geneticky predisponovaných osob spíše dán vystupňovanou dysregulovanou imunitní odpovědí hostitele než přímou infekcí glomerulů (Wu H. et al., 2020).

I přes nesporně široký orgánový tropismus viru není jasné, do jaké míry se na orgánovém poškození v souvislosti s onemocněním covid-19 podílí přímé virové působení.

2.3.4 Mechanismy vrozené imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2

Podobně jako v případě infekce jinými patogeny se i v obraně proti infekci virem SARS-CoV-2 uplatňují obě složky imunity, vrozená i adaptivní, jež jsou vzájemně propojeny. Mechanismy vrozené imunity představují první obrannou linii proti SARS-CoV-2 infekci. Mohou eliminovat nebo minimálně zpomalit virovou replikaci v místě infekce, než se rozvine adaptivní imunita, a také urychlit její rozvoj (Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022, Sette A., Crotty S., 2021).

Předpokladem pro obranu proti infekci je rozpoznání jak patogenu, tak i vlastních infikovaných či jinak poškozených buněk. Každý patogen, včetně virů, se vyznačuje pro něj typickými fylogeneticky zakonzervovanými molekulami – PAMPs (z angl. pathogen-associated molecular patterns). Poškození vlastních buněk signalizují molekuly DAMPs (z angl. damage-associated molecular patterns), které jsou uvolňovány do extracelulárního prostoru. Tyto molekuly – PAMPs a DAMPs – jsou rozpoznávány prostřednictvím receptorů PRRs (z angl. pattern recognition receptors), kterými jsou vybaveny zejména buňky vrozeného imunitního systému, ale také epitelální buňky. Primárním místem infekce a tudíž i imunologické detekce jsou dýchací cesty a plíce (Paludan S. R., Mogensen T. H., 2022) a první obrannou linií alveolární makrofágy (Merad M. et al., 2022).

Podstatou těchto senzorů je na základě detekce virového materiálu nebo materiálu z poškozených buněk aktivace signálních drah vedoucích k produkci cytokinů s protivirovými účinky, prozánětlivých cytokinů, chemotaktických cytokinů, atrakce a aktivace efektorových buněk imunitního systému a rozpoznání a indukce programované smrti infikovaných buněk s cílem zabránit šíření viru (Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022, Sette A., Crotty S., 2021). Existuje několik rodin PRRs, v souvislosti s infekcí SARS-CoV-2 jsou důležitými signálními dráhami ty, které jsou aktivovány receptory RLRs (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors), TLRs (toll-like receptors) a NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) (Sievers B. L. et al., 2024).

Membránové toll-like receptory (TLRs), nacházející se na povrchu buněčné membrány a v endozomech, detekují proteiny nebo genetický materiál virového nebo hostitelského původu. Cytoplazmatické RLRs (MDA5, RIG-I, LGP2) detekují virovou RNA, zejména replikační meziproducty. Prostřednictvím těchto senzorů jsou spuštěny dané signalizační dráhy a podle typu aktivovaného transkripčního faktoru vedou k produkci interferonů I. a III. typu s antivirovým účinkem a prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α) (Merad M. et al., 2022, Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022, Paludan S. R., Mogensen T. H., 2022).

Interferony I. a III. typu působí autokrinně a parakrinně na lokální imunitní buňky (neutrofilů, makrofágy) a na sousední neinfikované buňky s cílem limitovat další replikaci a šíření viru. Následně v těchto buňkách přes JAK/STAT1/2 signální dráhu vedou k expresi interferonem stimulovaných genů ISGs (interferon-stimulated genes) s protivirovým účinkem (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022). Například narušují vstup viru do buněk, potlačují virovou replikaci, translaci a také uvolnění nově vzniklých virionů z buněk (Martin-Sancho L. et al., 2021). Nepřímý protivirový účinek spočívá v atrakci buněk imunitního systému (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022). Potenciál působení interferonů I. a III. typu se liší. Odpověď zprostředkovaná interferony III. typu je omezena hlavně na epitelální povrchy, ve kterých navodí antivirový stav a brání systémové zánětlivé reakci, ke které naopak mohou vést interferony I. typu, jejichž receptory jsou exprimovány téměř všemi typy buněk (Lazear H. M. et al., 2019).

V imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2 a v patogenezi infekce se dále uplatňují cytoplazmatické NLRs. Do této rodiny patří inflamazóm NLRP3, jehož aktivace indukuje prostřednictvím kaspázy-1 zánětlivou buněčnou smrt tzv. pyroptózu a vede k produkci a uvolnění prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-18). Protivirové imunitní odpovědi se účastní také komplement a stresové dráhy, například HIF-1 (hypoxia-inducible factor) signální dráha, ale i mnoho dalších buněčných senzorů (Paludan S. R., Mogensen T. H., 2022, Sievers B. L. et al., 2024).

O významu interferonové signalizace v imunitní odpovědi proti SARS-CoV-2 svědčí například skutečnost, že jedinci, u kterých byly detekovány autoprotilátky proti IFN- α nebo IFN- ω (IFN I. typu), mají mnohem závažnější průběh onemocnění. Prevalence těchto protilátek v obecné dospělé populaci roste s věkem (0,18 % jedinců do 70 let vs. více než 4,5 % nad 70 let věku) a podílejí se zhruba na 20 % úmrtí asociovaných s covidem-19 (Bastard P. et al., 2021). Podobně mutace v genech účastnících se interferonové signalizace jsou spojeny s kritickým průběhem onemocnění (Merad M. et al., 2022). Snížená a opožděná produkce interferonů I. a III. typu, a naopak zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, TNF), je spojena se závažným průběhem onemocnění (Galani I. E. et al., 2021). Navíc suboptimální a opožděná produkce interferonů může vést k pozdní a relativně excesivní odpovědi adaptivní imunity (Moss P., 2022, Sette A., Crotty S., 2021).

Hlavní příčinou oslabené a opožděné produkce interferonů s protivirovým účinkem je schopnost viru SARS-CoV-2 interferovat s mechanismy vrozené imunity. Proto jsou u pacientů s infekcí SARS-CoV-2 oproti jiným respiračním virům detekovány nižší hladiny těchto

cytokinů (Galani I. E. et al., 2021, Merad M. et al., 2022). Proteiny viru SARS-CoV-2 (nestrukturální, akcesorní a strukturální) vyvinuly několik strategií, kterými v infikovaných buňkách narušují interferonovou signalizaci. Například znemožňují rozpoznání viru prostřednictvím PRRs, maskují virovou RNA a minimalizují vznikající replikační meziprodukty, blokují jednotlivé signalizační kaskády, jaderný transport a translaci proteinů hostitelské buňky (Minkoff J. M., tenOever B., 2023). Konkrétními příklady jsou protein N obalující virovou RNA nebo vznik replikačních organel, oboje oddalující detekci genetického materiálu viru SARS-CoV-2 buněčnými senzory.

Negativní dopad pro pacienty však může mít i nadměrná a protražovaná interferonová odpověď pravděpodobně indukci chemokinů a atrakcí dalších zánětlivých buněk (Merad M. et al., 2022). Excesivní a prolongovaná produkce interferonů I. a III. typu navíc brání reparaci plicního epitelu (Major J. et al., 2020). U jedinců se závažným covidem-19 pozoroval Lucas prolongovanou elevaci IFN I. a III. typu, zatímco u pacientů se středně závažným průběhem došlo po iniciálním vzestupu k jejich poklesu (Lucas C. et al., 2020).

Stran buněčné složky vrozené imunity mají centrální roli v patogenezi covidu-19 makrofágy a neutrofilny (Paludan S. R., Mogensen T. H., 2022). U kriticky nemocných pacientů dochází ke zvýšení počtu neutrofilů nejen v krvi, ale i v plicích (Sette A., Crotty S., 2021), kde se uvolněním sítě, tzv. neutrofilní extracelulární pasti, podílejí indukci prokoagulačního stavu na plicním poškození (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022). NK buňky, které se vyznačují významnou cytotoxickou a protivirovou aktivitou, vykazují v případě infekce SARS-CoV-2 známky dysfunkce (Witkowski M. et al., 2021). Podobně odpověď plasmacytoidních dendritických buněk, které jsou dominantním producentem interferonů I. a III. typu a brání šíření viru, je u závažného covidu-19 narušena (Venet M. et al., 2023).

I když jsou cytokiny nezbytné pro aktivaci imunitní odpovědi a eliminaci viru (Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022), aktivace výše zmíněných signálních drah a produkce cytokinů musí být adekvátně načasována, regulována a mít přiměřený rozsah. Dysregulovaná produkce prozánětlivých cytokinů, zejména synergické působení TNF- α a IFN- γ , vede k zánětlivé programované buněčné smrti (tzv. panoptóze) (Karki R. et al., 2021), která dále potencuje excesivní uvolnění cirkulujících cytokinů (cytokinová bouře) a systémovou inflamaci. Důsledkem tohoto bludného kruhu může být život ohrožující multiorgánové postižení (Diamond M. S., Kanneganti T. D., 2022).

2.3.5 Adaptivní imunita a SARS-CoV-2

V době aktivace interferonových signálních drah vrozené imunity podporují produkované cytokiny rozvoj složek adaptivní imunity (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022), která je založena na vazbě antigenu s antigenně specifickým receptorem. T- a B-lymfocytární odpověď proti SARS-CoV-2 lze v krvi detekovat již v prvním týdnu od nástupu symptomů (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020). Základním znakem adaptivní imunity je schopnost imunologické paměti, která je předpokladem ochrany při reinfekci. Tvorba paměťových T- a B-lymfocytů byla prokázána i v případě infekce SARS-CoV-2 (Dan J. M. et al., 2021). Částečnou ochranu může poskytovat zkřížená imunita následkem předchozí infekce jiným koronavirem schopným infikovat člověka (Sagar M. et al., 2021).

T-buněčná odpověď je důležitá pro ochranu před intracelulárními patogeny. SARS-CoV-2 specifická CD4⁺ a CD8⁺ T-buněčná odpověď je asociována s mírnějším průběhem covidu-19. Eliminaci virem infikovaných buněk zajišťují cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty exprimující dominantně IFN- γ , granzym B a TNF- α . Z populace CD4⁺ T-lymfocytů mají přímou protivirovou funkci pomocné Th1 lymfocyty produkující primárně IFN- γ a IL-2 (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020) a subpopulace cytotoxických CD4⁺ T-lymfocytů (CD4-CTL) (Meckiff B. J. et al., 2020). Folikulární pomocné CD4⁺ T-lymfocyty (Tfh) jsou důležité pro rozvoj B-lymfocytů a dlouhodobé humorální imunity. SARS-CoV-2 infekce indukuje také tvorbu regulačních a Th17 lymfocytů (Meckiff B. J. et al., 2020). T-lymfocyty (CD4⁺ a CD8⁺) jsou namířeny proti řadě antigenů viru SARS-CoV-2, imunodominantními jsou strukturální proteiny S, M, N, akcesorní protein ORF3 a nestrukturální protein nsp3 (Dan J. M. et al., 2021).

Dvě velké studie analyzovaly paměťové T-lymfocyty po dobu minimálně 6 měsíců od infekce se srovnatelnými výsledky. CD4⁺ T-lymfocyty byly v 1. a 6. měsíci detekovány u 89 % až 93 % pacientů, CD8⁺ T-lymfocyty pouze u 70 % pacientů, s poklesem na 50 % v 6. měsíci. Odhadovaný poločas obou subtypů byl 200 dní (Cohen K. W. et al., 2021, Dan J. M. et al., 2021). V případě středně závažného až kritického covidu-19 byla T-buněčná odpověď u většiny testovaných detekována i ve 12. měsíci od infekce (Guo L. et al., 2022). Nález v periférii jako takový však nemusí vypovídat o celkové imunitní odpovědi, jelikož pro účinnou kontrolu infekce v infikovaných tkáních je nezbytná lokální imunita (Sette A., Crotty S., 2021). Přítomnost aktivovaných rezidentních tkáňových T-buněk v respiračním traktu pacientů s covidem-19 koreluje s mladším věkem a přežitím (Szabo P. A. et al., 2021).

V ochraně proti SARS-CoV-2 infekci je důležitá také humorální složka adaptivní imunity. Protilátky proti spike proteinu viru SARS-CoV-2 třídy IgM, IgA a IgG dosahují v séru maximálních hladin ve stejné době, tj. mezi 16. až 30. dnem od symptomů, s následným rapidnějším poklesem IgM a IgA protilátek. Hladiny IgM, IgG a v menší míře i IgA protilátek v krvi korelují s hladinami ve slinách (Isho B. et al., 2020) a hladiny cirkulujících protilátek pravděpodobně také odrážejí jejich hladiny v plicích (Sette A., Crotty S., 2021). Protilátky sehrávají důležitou roli v lokální imunitě, nakolik mohou neutralizačním efektem eliminovat virus ještě předtím, než se začne replikovat v buňkách (Sette A., Crotty S., 2022). Hlavním cílem neutralizačních protilátek je spike protein, především receptorová vazebná doména (RBD) (Piccoli L. et al., 2020). Hladiny anti-RBD a neutralizačních protilátek vzájemně korelují (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020, Piccoli L. et al., 2020). Hladina neutralizačních protilátek je důležitá v ochraně před symptomatickou SARS-CoV-2 infekcí (Khoury D. S. et al., 2021), ale jejich přítomnost sama o sobě nebyla asociována s méně závažným průběhem onemocnění (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020). O tom, že v ochraně před SARS-CoV-2 infekcí hraje důležitou roli T-buněčná imunita, svědčí například také skutečnost, že i pacienti s Brutonovou agamaglobulinemií se mohou z nemoci zcela vyléčit (Soresina A. et al., 2020).

Kromě neutralizační funkce mají protilátky efektorovou funkci, která je založena na jejich vazbě prostřednictvím Fc receptorů přítomných na buňkách imunitního systému (tzv. na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita, ADCC; na protilátkách závislá buněčná fagocytóza, ADCP) nebo vazbě na komplement (komplement dependentní cytotoxicita, CDC). Nepřímým důkazem, že tímto mechanismem působí i protilátky v případě SARS-CoV-2 infekce, může být skutečnost, že humorální odpověď pacientů, kteří nepřežili covid-19, vykazovala sníženou efektorovou aktivitu závislou na Fc receptorech (Zohar T. et al., 2020). Přímým důkazem je nález nižších hladin anti-S1 IgG protilátek indukujících buněčnou fagocytózu (ADCP) u jedinců s průlomovou SARS-CoV-2 infekcí po očkování (Kemlin D. et al., 2023).

Míra sérokonverze v imunokompetentní populaci je vysoká. Kombinací sérologických metod byly SARS-CoV-2 IgG protilátky detekovány u 96,5 % jedinců (medián 31 dnů od diagnózy) (Prendecki M. et al., 2020). Guo et al. prokázal perzistenci anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek u většiny jedinců ve 12. měsíci po prodělání středně závažného až kritického covidu-19 (anti-N u 82 %, anti-S u 95,2 %, anti-RBD u 94,2 % a neutralizační protilátky u 81,6 %) (Guo L. et al., 2022). Titr neutralizačních protilátek se v této studii nelišil v 6. a 12. měsíci od infekce, k signifikantnímu poklesu však došlo u jedinců ve věku nad 60 let

a u pacientů s kritickým průběhem nemoci. Kinetika protilátek odpovídá rostoucí aktivitě paměťových B-lymfocytů a jejich stabilizaci mezi šestým až osmým měsícem, kdy dosáhnou fáze plató (Cohen K. W. et al., 2021). Většinu paměťových buněk tvoří IgG+ paměťové B-lymfocyty, jen 5 % připadá na IgA+ B-buňky (Dan J. M. et al., 2021).

Titry anti-spike a anti-RBD IgG protilátek a frekvence paměťových B-lymfocytů korelují se závažností onemocnění a jsou vyšší u hospitalizovaných pacientů v porovnání s jedinci s asymptomatickým nebo mírným průběhem covidu-19 (Dan J. M. et al., 2021). T-buněčná odpověď může být u asymptomatických jedinců přítomna, aniž by došlo k tvorbě protilátek (Sekine T. et al., 2020). Zuo et al. detekoval T-buněčnou odpověď u všech asymptomatických jedinců, ale v menším rozsahu oproti těm se symptomatickou infekcí (Zuo J. et al., 2021). V rámci středně závažného až kritického průběhu covidu-19 však nebyly pozorovány rozdíly ve velikosti T-buněčné odpovědi (Guo L. et al., 2022). Frekvence CD8+ paměťových T-lymfocytů se u hospitalizovaných a nehospitalizovaných pacientů nelišila, frekvence CD4+ buněk byla u hospitalizovaných jedinců se závažnějším průběhem nižší (Dan J. M. et al., 2021).

S ohledem na nižší titry anti-spike ale i antinukleokapsidových IgG protilátek u asymptomatických jedinců, i když u nich lze pozorovat velmi heterogenní protilátkovou odpověď pravděpodobně i následkem zkřížené imunity (Piccoli L. et al., 2020), je potřeba u této skupiny počítat s možnou falešnou negativitou méně senzitivních sérologických testů, které tak neodhalí prodělanou nákazu. Navíc testy analyzující protilátky proti nukleokapsidě nemusí být vzhledem k jejich rychlejšímu poklesu (Chavarot N. et al., 2021, Marot S. et al., 2021) spolehlivým indikátorem prodělané infekce v době delší než 6 měsíců od infekce. Proto jsou také anti-RBD IgG častěji využívaným sérodiagnostickým markerem, i když nerozliší infekci od stavu po očkování (Sette A., Crotty S., 2022).

Podobně jako v případě vrozené imunity interferuje SARS-CoV-2 také s adaptivní imunitou. Kromě samotných mutací a vzniku nových variant (Guo L. et al., 2022, Moss P., 2022), například také snížením prezentace antigenů downregulací molekul MHC I. třídy přímou interakcí s akcesorním proteinem ORF8 (Zhang Y. et al., 2021). Navíc existují důkazy o tom, že se SARS-CoV-2 může šířit prostřednictvím vzájemné fúze buněk, a být tak rezistentní k neutralizačním protilátkám (Zeng C. et al., 2022).

Ačkoliv za předpokladu dostatečné buněčné odpovědi je možné zotavení z infekce bez neutralizačních protilátek, koordinovaná a časná odpověď všech složek adaptivní imunity je pro eliminaci viru a ochranu před závažným covidem-19 účinnější než parciální odpověď. Nekoordinovaná (parciální) adaptivní odpověď je pozorována především u starších pacientů,

kteří v důsledku menšího počtu naivních T-lymfocytů predisponují k závažnějšímu průběhu nemoci (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020).

2.3.6 Role imunitního systému v rozvoji závažného průběhu covidu-19 a postcovidového syndromu

Závažný průběh covidu-19 je charakterizován hypoxémií často s přítomností rozsáhlých plicních infiltrátů, který může progredovat až do kritického stavu s respiračním selháním, septickým šokem nebo multiorgánovou dysfunkcí (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024). V ohrožení jsou zejména jedinci s přítomnými rizikovými faktory, jakými jsou vyšší věk, mužské pohlaví, stavy spojené s imunosupresí a chronická onemocnění včetně obezity vyššího stupně (Williamson E. J. et al., 2020). Etiologie závažného covidu-19 je multifaktoriální, a ačkoliv je iniciálním spouštěčem přímé virové působení a virová replikace v postižených tkáních, není snadné rozlišit, do jaké míry se na další progresi onemocnění podílí samotný virus a velikost virové nálože a do jaké imunitní mechanismy hostitele a jejich dysregulace.

Jedním z faktorů, který vyvolává masivní zánětlivou odpověď hostitele vedoucí k závažnému covidu-19, je pravděpodobně přímá infekce buněk imunitního systému (monocytů a makrofágů) protilátkami opsonizovaným virem SARS-CoV-2 prostřednictvím Fc receptorů. Tyto infikované buňky sice nevedou k produkci infekčních virionů, místo toho však následkem aktivace inflamazomů virem SARS-CoV-2 podléhají pyroptóze. Zánětlivé mediátory uvolněné z těchto buněk mohou způsobit cytokinovou bouři s následnou hyperinflamací až multiorgánovým selháním, na které se podílejí nejen buňky vrozeného imunitního systému (neutrofily, makrofágy a NK buňky), ale také dysregulace adaptivní složky imunity, zejména T-lymfocytů (Junqueira C. et al., 2022, Fajgenbaum D. C., June C. H., 2020). Longitudinální analýza pacientů hospitalizovaných z důvodu covidu-19 prokázala pozitivní asociaci mezi závažností onemocnění a cytokiny spojenými se syndromem z uvolnění cytokinů (cytokinovou bouří) a inflamazomem indukovaných cytokinů (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 a TNF). Naopak u pacientů, u kterých došlo i přes iniciálně středně závažný průběh k vyléčení, byla pozorována nízká exprese prozánětlivých cytokinů a vyšší exprese genů spojených s reparací tkání, respektive růstových faktorů (Lucas C. et al., 2020). Rovněž bylo prokázáno, že vysoké sérové hladiny IL-6, IL-8 a TNF- α u hospitalizovaných pacientů jsou signifikantními prediktory závažnosti covidu-19 a úmrtí (Del Valle D. M. et al., 2020).

O tom, že významnou roli v další progresi nemoci má imunitní dysregulace, svědčí nejspíše i to, že mezi pacienty se středně závažným a závažným průběhem nebyly v žádném z analyzovaných momentů pozorovány signifikantní rozdíly v množství virové RNA ze vzorků nazofaryngeálních výtěrů, i když u druhé skupiny byl během sledování zaznamenán pomalejší pokles virové nálože (Lucas C. et al., 2020).

V pitevních nálezech menšího souboru pacientů zemřelých v důsledku covidu-19 bylo pravidelným nálezem difuzní alveolární poškození a významně zastoupeným buněčným typem v plicích byly makrofágy v intersticiu. Neutrofilní infiltrát byl pozorován pouze u třetiny pacientů (Hanley B. et al., 2020). Buňky myeloidní krevní řady v respiračním systému u pacientů s covidem-19 vykazují hyperinflamatorní fenotyp a vyšší frekvence těchto buněk koreluje s mortalitou a vyšším věkem (Szabo P. A. et al., 2021). Hlavním podtypem lymfocytů v plicích byly CD4⁺ T-buňky, CD56⁺ NK buňky byly nalezeny jen vzácně. V lymfatických uzlinách a ve slezině byla pozorována deplece lymfocytů (zvláště CD8⁺ T-buněk a FOXP3⁺ regulačních T-lymfocytů) a hemofagocytóza (Hanley B. et al., 2020). Nerovnováha regulačních T-lymfocytů a Th17 lymfocytů ve prospěch Th17 buněk potencuje zánětlivý stav s uvolněním cytokinů, plicní poškození a závažný průběh covidu-19 (Sadeghi A. et al., 2021).

U všech pacientů bylo také pozorováno mikro- nebo makrotrombotické postižení některého z orgánů (Hanley B. et al., 2020). Právě dysbalance mezi koagulačním a fibrinolytickým systémem je charakteristickou známkou závažného covidu-19 a na dalším rozvoji prokoagulačního stavu se významně podílejí složky imunitního systému (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022).

Onemocnění covid-19 je mimo jiného spojeno s dlouhodobými následky, na kterých se rovněž podílí imunitní systém hostitele, a to i v případě mírného průběhu onemocnění. Podle Světové zdravotnické organizace je postcovidový syndrom neboli „long covid“ charakterizován dlouhotrvajícími symptomy, které mohou přetrvávat nebo se nově objevit po zotavení z nemoci covid-19. Jde o poměrně heterogenní symptomy z postižení různých orgánů, nejčastěji je udávána únava, dušnost a kognitivní dysfunkce (World Health Organization, 2023). V patogenezi long covidu se pravděpodobně uplatňuje perzistence virových antigenů ve tkáních, reaktivace latentní herpesvirové infekce a chronický zánět. U pacientů s long covidem byly ve srovnání s kontrolní skupinou pozorovány významné rozdíly v populaci cirkulujících buněk myeloidní a lymfoidní krevní řady, s vyšší frekvencí neklasických monocytů a nižší frekvencí konvenčních dendritických buněk a centrálních paměťových CD4⁺ T-buněk. Jedinci s long covidem měli rovněž vyšší hladiny SARS-CoV-2 specifických protilátek, ale také vyšší

hladiny protilátek proti jiným virovým patogenům, zvláště proti viru Epstein-Barrové (Klein J. et al., 2023).

2.4 Imunitní aspekty pacientů po transplantaci ledviny v souvislosti s covidem-19

2.4.1 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci SARS-CoV-2

Infekce představují jednu z nejčastějších komplikací po transplantaci ledviny a jejich průběh bývá oproti imunokompetentní populaci mnohem závažnější. Příčinou je jednak chronická imunosupresivní léčba, jednak přidružené komorbidity. To je zřejmě také důvodem, proč patří tito pacienti mezi nejohroženější skupinu z hlediska mortality na covid-19 (Williamson E. J. et al., 2020). Imunosupresivní léčba zasahuje přímo nebo nepřímo obě složky adaptivní imunity. Z těchto důvodů lze předpokládat nedostatečnou buněčnou a protilátkovou odpověď na infekci virem SARS-CoV-2. Tento předpoklad vychází také z nízké míry sérokonverze po infekci virem chřipky u pacientů po orgánových transplantacích (Hirzel C. et al., 2019). Studie citované v této kapitole zahrnují pouze jedince neočkované proti SARS-CoV-2.

Data týkající se humorální odpovědi transplantovaných pacientů na infekci virem SARS-CoV-2 se liší v rámci jednotlivých studií a významné rozdíly jsou pozorovány i v závislosti na použité metodě detekce, zejména na cílovém antigenu. Z 38 pacientů po transplantaci ledviny s PCR verifikovanou nákazou byla sérokonverze (medián 35 dní od diagnózy) pozorována u 68,4 % jedinců využitím metody stanovující IgG protilátky proti nukleokapsidě (N), ale až u 81,6 % až 92,1 % (v závislosti na konkrétní metodě), pokud byly testovány IgG protilátky proti receptorové vazebné doméně (RBD). U třech pacientů (7,9 %) nebyly detekovány protilátky ani jednou z daných metod a tito pacienti představují skutečné procento non-responderů (Prendecki M. et al., 2020). Naopak v jiné studii bylo procento pacientů s anti-N a anti-S1 IgG protilátkami ve 3. měsíci od nástupu symptomů stejné – 76,9 % (Bertrand D. et al., 2021). Pro srovnání, data z populace hemodialyzovaných pacientů ukázaly podobnou míru sérokonverze (90 %), navíc jediným faktorem signifikantně asociovaným s absencí humorální odpovědi u dialyzovaných pacientů byla imunosuprese (Sakhi H. et al., 2021). Nezávislá studie zahrnující 70 pacientů po transplantaci solidních orgánů s potvrzenou infekcí, z nichž 37 pacientů bylo po izolované a 6 pacientů po kombinované transplantaci ledviny, detekovala antinukleokapsidové protilátky (IgM, IgG a IgA) jen u 51 % jedinců (medián 48 dní od diagnózy). Séropozitivita byla signifikantně nižší u pacientů po transplantaci ledviny oproti příjemcům štěpu jater, srdce nebo plic (42 % vs. 65 %). Procento séropozitivních

případů bylo nižší u pacientů ve stavu vyžadujícím oxygenoterapii nebo hospitalizaci na jednotce intenzivní péče (Burack D. et al., 2021).

Jiná data poukazují na zachovanou protilátkovou odpověď v této populaci. Menší francouzská studie analyzovala humorální odpověď na SARS-CoV-2 infekci u pacientů po transplantaci ledviny testováním IgM a IgG protilátek proti rekombinantním nukleokapsidovým a spike antigenům využitím enzymové imunoanalýzy. Během druhého týdne od nástupu symptomů došlo k sérokonverzi u všech přeživších pacientů. Ze čtyř pacientů, kteří zemřeli v souvislosti s covidem-19, nebyla pozorována sérokonverze v den úmrtí ani u jednoho (7. až 16. den od vzniku symptomů). Hladiny protilátek nekorelovaly se závažností onemocnění (Benotmane I. et al., 2020). To je v rozporu s výsledky v obecné populaci, kde hospitalizovaní jedinci vytvořili vyšší titry protilátek v porovnání s nehospitalizovanými či asymptomatickými subjekty (Piccoli L. et al., 2020). Burack et al. ukázal, že faktorem, který signifikantně zvyšuje tvorbu postinfekčních protilátek, je delší doba od transplantace, zatímco negativním faktorem sérokonverze byla udržovací imunoprese více než dvěma přípravky (Burack D. et al., 2021).

Vyšetřením kinetiky protilátek byl pozorován rapidní pokles antinukleokapsidových IgG protilátek mezi 2. až 6. měsícem od diagnózy covidu-19 neohledě na závažnost onemocnění, přičemž více než 60 % pacientů nemělo v půlroce detekováno žádné protilátky (Chavarot N. et al., 2021). Naproti tomu anti-S1 IgG protilátky byly v jiné studii, ačkoliv s malým vzorkem subjektů, detekovány v 6. měsíci u 89,5 % pacientů po transplantaci ledviny (Fernández-Ruiz M. et al., 2021). Rozdílný pokles anti-N a anti-spike protilátek nejspíše nebyl způsoben rozdílným průběhem onemocnění v těchto kohortách, jelikož v obou studiích klinický stav většiny pacientů vyžadoval hospitalizaci. Rychlý pokles antinukleokapsidových protilátek potvrzují i data týkající se imunokompetentní populace zdravotníků, kde byl pozorován pokles anti-N IgG protilátek mezi 2. a 3. měsícem od infekce, zatímco hladiny anti-spike a anti-RBD IgG se během prvních tří měsíců nelišily (Marot S. et al., 2021). Podobně rychlejší pokles antinukleokapsidových protilátek oproti anti-spike IgG protilátkám byl zaznamenán v populaci hemodialyzovaných pacientů. Po adjustaci na pohlaví a věk byl jediným faktorem asociovaným s tímto poklesem nezávažný průběh onemocnění (Sakhi H. et al., 2021).

Podobně jako v případech humorální imunity jsou i data hodnotící buněčnou odpověď nekonzistentní. Bertrand et al. detekoval na malém vzorku pacientů po transplantaci (n = 26) SARS-CoV-2 specifické IFN- γ produkující T-lymfocyty ve 3. měsíci u všech jedinců, a to i u té části pacientů, která nevytvořila anti-S1 IgG protilátky. Dominantními antigeny T-buněčné

odpovědi byly proteiny S, N a M. Závažnost symptomů ani redukce imunosuprese v průběhu covidu-19 neměla vliv na celkový počet SARS-CoV-2 specifických T-buněk (Bertrand D. et al., 2021). V jiné studii, též limitované malým vzorkem pacientů po transplantaci ledviny (n = 21), byla ve 4. a 6. měsíci od infekce detekována SARS-CoV-2 specifická CD4+ T-buněčná odpověď u 57,1 % a 47,4 % a CD8+ T-buněčná odpověď u 19 % a 42,1 % pacientů. Rozdíly nebyly statisticky významné (Fernández-Ruiz M. et al., 2021).

Oproti obecné populaci je adaptivní imunitní odpověď u imunosuprimované populace opožděná. Španělská studie porovnávala buněčnou odpověď během akutní fáze covidu-19 a v průběhu rekonvalescence v malé kohortě 16 imunokompetentních jedinců a 28 pacientů po transplantaci solidních orgánů, z nichž 18 bylo po transplantaci ledviny. Během akutní fáze nemoci (medián 7 dní od PCR verifikované infekce) byla SARS-CoV-2 T-buněčná odpověď dominantnější u imunokompetentní populace než u transplantovaných jedinců, zvláště u těch se závažnějším průběhem onemocnění. Naopak během rekonvalescence (medián 40 dnů od diagnózy) byla již T-lymfocytární odpověď u pacientů po orgánových transplantacích výraznější, zatímco u imunokompetentních jedinců byla buněčná odpověď slabší oproti akutní fázi. Ve skupině transplantovaných jedinců byl nejsilnějším antigenem T-lymfocytů spike protein, v kontrolní skupině navíc také protein M (Favà A. et al., 2021).

Časná a koordinovaná imunitní odpověď je nezbytná k účinné eliminaci viru. U pacientů po transplantaci ledviny může vylučování viabilních virových částic z epitelu nosohltanu trvat až 38 dnů od nástupu symptomů, a to i při nízké virové náloži (Benotmane I. et al., 2021). V jiné studii byla u pacientů po transplantaci ledviny malá, ale pořád detekovatelná virová nálož prokázána až po dobu dvou měsíců (Caillard S. et al., 2021). Naproti tomu medián vylučování virionů v obecné populaci byl 20 dní (Zhou F. et al., 2020). U jedinců po orgánových transplantacích bylo také pozorováno prolongované vylučování virionů z epitelu trávicího traktu (Cerrada-Romero C. et al., 2022). Perzistentní vylučování virionů může stimulovat T-lymfocyty a být jedním z důvodů robustnější T-buněčné odpovědi v pozdějším stadiu covidu-19 oproti akutní fázi nemoci (Favà A. et al., 2021).

Data týkající se doby vylučování virových částic a velikosti virové nálože v souvislosti se závažností onemocnění jsou nekonzistentní. Zatímco v jedné studii nebyla virová nálož ze vzorku nazofaryngeálního výtěru na rozdíl od plazmatické virové nálože asociována se závažností covidu-19 a mortalitou (Benotmane I. et al., 2020), v jiné studii byla u pacientů se závažnějším průběhem onemocnění pozorována vyšší virová nálož ze vzorku nazofaryngu a delší doba vylučování viru (Liu Y. et al., 2020). Každopádně perzistence virových částic může

být jednou z příčin postcovidového syndromu neboli „long covidu“ (Klein J. et al., 2023). To by mohlo vysvětlovat relativně vysokou prevalenci tohoto syndromu v populaci pacientů po transplantaci ledviny (Amorim C. et al., 2022).

2.4.2 Vakcíny proti SARS-CoV-2

Očkování představuje jedno z nejdůležitějších preventivních opatření před infekcí, závažným průběhem onemocnění a úmrtím. Od zahájení očkování proti SARS-CoV-2 byly vyvinuty a do praxe zavedeny vakcíny, které lze rozdělit do tří kategorií: mRNA vakcíny, vektorové a proteinové vakcíny (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024).

Principem mRNA vakcín je vlastní syntéza virového proteinu, který je zakódován v mRNA, s následnou aktivací vrozených a adaptivních imunitních mechanismů (Tejaro J. R., Farber D. L., 2021) proti tomuto proteinu. Vektorové vakcíny fungují rovněž na principu přenosu genetické informace pro virový protein, který indukuje u očkovaného jedince imunitní odpověď, ale tato genetická informace je přenesena prostřednictvím nosiče (vektoru), nejčastěji adenoviru. V případě proteinových vakcín je do těla vpraven přímo virový protein.

Imunogenem vakcín proti covidu-19 je spike protein a receptorová vazebná doména (RBD) spike proteinu je cílem nejen postinfekčních, ale také postvakcinačních neutralizačních protilátek (Jackson C. B. et al., 2022). Ačkoliv byla prokázána schopnost anti-spike protilátek prostřednictvím opsonizace viru a Fc receptorů na monocytech infikovat tyto buňky imunitního systému, neutralizační protilátky indukované mRNA vakcínami jejich infekci nepodporují (Junqueira C. et al., 2022).

2.4.3 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na očkování proti SARS-CoV-2

Imunogenicita je důležitou vlastností vakcín a testování postvakcinační imunitní odpovědi má velkou vypovídací hodnotu, neboť jak humorální, tak buněčná odpověď koreluje s ochranou před infekcí (Kemlin D. et al., 2023). Britským autorům se dokonce podařilo definovat konkrétní hladiny anti-SARS-CoV-2 protilátek korelující s 80% efektivitou vektorové vakcíny v prevenci symptomatické infekce variantou *Alpha* v obecné populaci. Na základě těchto dat lze extrapolovat přibližnou účinnost dalších vakcín (Feng S. et al., 2021). Belgická studie zahrnující 53 virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny, očkovaných třemi dávkami mRNA vakcíny, analyzovala výskyt symptomatické průlomové infekce virem SARS-CoV-2

a koreláty ochrany před infekcí. Během 6 měsíců od posilovací dávky vakcíny, kdy dominovaly varianty *Delta* a *Omicron*, byla infikována třetina jedinců. U těchto pacientů byly ve srovnání s neinfikovanými jedinci pozorovány signifikantně nižší hladiny anti-S1 IgG, anti-RBD IgG a neutralizačních protilátek a signifikantně nižší frekvence S2-specifických IFN- γ produkujících buněk. Nejsilnějším prediktorem průlomové infekce byl titr neutralizačních protilátek a S2-specifická buněčná odpověď (Kemlin D. et al., 2023). Ačkoliv v celonárodní norské studii s více než 3 600 pacienty po transplantaci ledviny nebyl pozorován rozdíl v riziku infekce variantou *Omicron* při různých hladinách postvakcinačních protilátek, pacienti s robustnější humorální odpovědí po očkování byli v nižším riziku progresu do závažného onemocnění a v nižším riziku úmrtí asociovaného s covidem-19 (Hovd M. et al., 2023).

Imunitní odpověď na očkování proti SARS-CoV-2 je u pacientů po transplantaci ledviny oproti zdravým kontrolám oslabená. Zatímco u imunokompetentních jedinců indukují vakcíny proti SARS-CoV-2 vznik germinálních center důležitých pro produkci neutralizačních protilátek, u imunosuprimovaných pacientů je tento proces narušen (Lederer K. et al., 2022). Z toho plyne porucha postvakcinační imunologické paměti, která je základem pro dlouhodobou ochranu před infekcí (Sette A., Crotty S., 2022). Míra sérokonverze v populaci pacientů po transplantaci ledviny se napříč studiemi výrazně liší. V jedné z prvních studií byly v časném období (8 ± 1 den) od druhé dávky mRNA vakcíny anti-S1 IgG a neutralizační protilátky detekovány u všech imunokompetentních jedinců, ale pouze u 2,6 % pacientů po transplantaci ledviny. Navíc neutralizační protilátky nebyly detekovány ani u jednoho transplantovaného pacienta. K významnějšímu nárůstu nedošlo ani během dalších 11 až 19 dnů sledování. Poměrně vysoká sérokonverze (85 % v případě anti-S1 IgG a 77 % v případě neutralizačních protilátek) byla pozorována rovněž u dialyzovaných jedinců (Sattler A. et al., 2021).

O něco lepší, přesto nepříznivé výsledky ukázala jiná studie s více než trojnásobným počtem pacientů po transplantaci ledviny. V rozmezí 10 až 20 dnů po plném očkování mRNA vakcínami byla sérokonverze pozorována u 37,5 % virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny. V kontrolní skupině byla sérokonverze stoprocentní. Transplantovaní pacienti tvořili signifikantně nižší hladiny anti-spike IgG oproti zdravotníkům (Grupper A. et al., 2021). Vzhledem k tomu, že z této studie byli vyloučeni pacienti s pozitivními antinukleokapsidovými protilátkami, které v čase po infekci rychle klesají (Chavarot N. et al., 2021, Marot S. et al., 2021), mohlo být skutečné procento responderů ještě nižší.

Míra sérokonverze v několika dalších studiích v období 16–40 dnů po 2. dávce mRNA vakcíny u pacientů po transplantaci ledviny se pohybuje od 4 do 66 % (Danthu C. et al., 2021,

Bertrand D. et al., 2021, Rozen-Zvi B. et al., 2021, Arias-Cabrales C. et al., 2023). Různé výsledky mohou být ovlivněny také zahrnutím pacientů po prodělané asymptomatické infekci. Tato data nejsou překvapivá, jelikož již dřívější studie s pacienty po orgánových transplantacích prokázaly oslabenou humorální odpověď po očkování proti viru chřipky (Baluch A. et al., 2013).

V rámci analýzy buněčné odpovědi detekovali Sattler et al. spike-specifické CD4+ T-lymfocyty 7. až 9. den po 2. dávce mRNA vakcíny téměř u všech pacientů po transplantaci ledviny. Oproti zdravým kontrolám byla tato odpověď spojena se slabší produkcí efektorových cytokinů, slabší diferenciací do paměťových buněk a s downregulací drah účastnících se cytokinové signalizace a imunitní aktivace. Spike-specifická CD8+ T-buněčná odpověď byla detekována pouze u 5 % transplantovaných jedinců (Sattler A. et al., 2021). V jiných kohortách virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny byla T-buněčná odpověď v rozmezí 2 týdnů až jednoho měsíce po 2. dávce mRNA vakcíny přítomna u 22 až 55 % jedinců (Arias-Cabrales C. et al., 2023, Cucchiari D. et al., 2021). Tyto studie nerozlišovaly CD4+ a CD8+ T-lymfocytární odpověď.

V Cucchiariho studii byly postvakcinační protilátky a buněčná odpověď současně detekovány u necelých 20 % jedinců. Ve skupině IgG- pacientů byla buněčná odpověď detekována u poloviny, ve skupině IgG+ jedinců pouze v 18 % případů. Séropozitivní pacienti měli oproti séronegativním robustnější buněčnou odpověď (Cucchiari D. et al., 2021).

Doba, po kterou poskytuje očkování ochranu, není jasná. Počet anti-S IgG+ pacientů po transplantaci ledviny po 2. dávce mRNA vakcíny byl v rozmezí 1. a 6. měsíce o 13 % nižší (66 % vs. 53 %), ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Naproti tomu počet pacientů s detekovanou T-buněčnou odpovědí byl po 6. měsíci signifikantně nižší (22 % vs. 9 %). V kontrolní skupině imunokompetentních jedinců zůstali séropozitivní všichni (Arias-Cabrales C. et al., 2023).

Významným faktorem asociovaným se sníženou imunogenicitou vakcín proti covidu-19 v transplantované populaci je imunosupresivní léčba. Negativní vliv na tvorbu postvakcinačních protilátek byl prokázán v případě vysokodávkové kortikoterapie (≥ 125 mg) v posledním roce, udržovací imunosuprese třemi preparáty (CNI, MMF, mTOR nebo azathioprin) (Grupper A. et al., 2021), léčby mykofenolát mofetilem (Grupper A. et al., 2021, Boyarsky B. J. et al., 2021, Rozen-Zvi B. et al., 2021), depleční léčby v posledním roce (Cucchiari D. et al., 2021) a léčby blokátorem kostimulace belataceptem (Bertrand D. et al., 2021). Významný vliv imunosuprese na horší imunogenicitu vakcín u transplantovaných

pacientů podporují data z populace dialyzovaných pacientů, u kterých je imunitní odpověď po očkování, jak již bylo uvedeno, blízká odpovědi v obecné populaci (Bertrand D. et al., 2021, Sattler A. et al., 2021). Kratší doba od transplantace a tedy i od indukční léčby a horší funkce štěpu je rovněž spojena s nižší sérokonverzí (Arias-Cabrales C. et al., 2023, Rozen-Zvi B. et al., 2021). Z dalších negativních faktorů sérokonverze ale i T-buněčné odpovědi byl v některých studiích diabetes (Thomson T. et al., 2022, Cucchiari D. et al., 2021). S porušenou buněčnou odpovědí byla asociována také horší funkce štěpu (Cucchiari D. et al., 2021). Naopak imunizace předchozí nákazou významně zvyšuje imunitní odpověď po očkování proti SARS-CoV-2 (tzv. hybridní imunita) (Boyarsky B. J. et al., 2021).

Důležitým faktorem spojeným s porušenou imunitní odpovědí po očkování, jak v obecné (Collier D. A. et al., 2021), tak v transplantované populaci, je vyšší věk (Grupper A. et al., 2021, Arias-Cabrales C. et al., 2023, Boyarsky B. J. et al., 2021, Rozen-Zvi B. et al., 2021). Je nejasné, do jaké míry se na slabší imunogenicitě vakcín ve starší populaci uplatňuje přirozený jev imunosenescence, nebo zda jsou příčinou samotné vakcíny. V obecné populaci starších očkováných jedinců bylo pozorováno méně somatických hypermutací v genech pro povrchové receptory B-lymfocytů. Možným vysvětlením porušené neutralizační schopnosti po očkování u starších jedinců je nižší hladina a/nebo afinita protilátek, snížená odpověď CD4+ pomocných T-lymfocytů nebo jejich kombinace (Collier D. A. et al., 2021).

Jednou z možností, jak v případě transplantovaných jedinců zlepšit imunogenicitu vakcín, je aplikace posilovacích dávek. Očkování 3. dávkou mRNA vakcíny vedlo ve španělské kohortě k signifikantnímu zvýšení počtu jedinců s detekovanou protilátkovou odpovědí z 66 % na 92 % (doba mezi aplikací 2. a 3. dávky a odběry byla 28 dnů). Počet pacientů s vysokým titrem protilátek se po posilovací dávce zvýšil až šestnáctinásobně (Arias-Cabrales C. et al., 2023). Aplikace 3. dávky vakcíny vedla rovněž ke zvýšení hladin a avidity anti-RBD IgG protilátek a také ke zvýšení hladin neutralizačních protilátek (Kemlin D. et al., 2023). Sérokonverze a hladiny protilátek byly po 3. dávce vyšší u pacientů, kteří byli primoočkováni mRNA vakcínou oproti vektorové vakcíně (Thomson T. et al., 2022). S každou další posilovací dávkou vakcíny se procento responderů a hladina protilátek zvyšuje, přesto však u části pacientů nedochází k rozvoji humorální imunity ani po několika dávkách (Hovd M. et al., 2023, Thomson T. et al., 2022).

Efekt posilovacích dávek již není tak zřejmý v případě T-buněčné odpovědi. Očkování 3. dávkou sice významně zvýšilo počet pacientů s detekovanou buněčnou odpovědí z 23 % na 32 %, přesto je toto procento o polovinu nižší ve srovnání s obecnou populací (Arias-Cabrales

C. et al., 2023). V jiné studii nevedla aplikace 1. boosteru (tj. 3. dávky) k významným změnám SARS-CoV-2 S1/S2 specifické buněčné odpovědi (Kemlin D. et al., 2023) a většina virus-naivních pacientů nevyvine T-buněčnou odpověď ani po 2. boosteru (tj. 4. dávce) (Thomson T. et al., 2022).

Ve srovnání se zdravými kontrolami či dialyzovanými jedinci je imunitní odpověď po posilovacích dávkách vakcín u transplantovaných pacientů slabší, ale její nárůst je právě v této populaci nejmarkantnější (Arias-Cabrales C. et al., 2023). Tito pacienti tak zřejmě mohou profitovat z aplikace posilovacích dávek nejvíce.

2.4.4 Efektivita vakcín

Důležitým kritériem vakcín je jejich efektivita, tedy míra ochrany, kterou poskytují v reálných podmínkách. Je vyjádřena procentem redukce nákazy v očkované populaci oproti neočkovaným jedincům. Efektivita vakcín proti SARS-CoV-2 v obecné populaci je vysoká. Analýza 68 kontrolovaných a observačních studií zahrnujících mRNA vakcíny (BNT162b2, mRNA-1273) a vektorové vakcíny (ChAdOx1 nCoV-19, Ad26.COV2-S) ukázala vysokou časnou účinnost (do 42 dnů od ukončení základního očkování) v prevenci infekce (83 %), hospitalizace (92 %) a úmrtí (91 %) na jakoukoliv variantu viru, ačkoliv se zjevným poklesem efektivity proti všem událostem (o 21 %, 13 %, 5 %) během dalšího sledování (≥ 112 dnů od základního očkování) (Wu N. et al., 2023). Efektivitu vakcín lze zvýšit aplikací posilovací dávky (Andrews N. et al., 2022).

Jedinci s imunodeficitem včetně pacientů po transplantaci solidních orgánů, kteří byli plně očkováni mRNA vakcínami nebo vektorovou vakcínou proti SARS-CoV-2, jsou ve srovnání s obecnou populací ve vyšším riziku průlomové infekce (Sun J. et al., 2022). Množství studií analyzujících reálnou účinnost vakcín v populaci pacientů po transplantaci ledviny je limitované. Americká studie zahrnující 2 151 pacientů po orgánových transplantacích, z nichž 967 bylo po transplantaci ledviny, ukázala u očkováných jedinců 81% redukci rizika symptomatického covidu-19 oproti neočkovaným pacientům. Většina pacientů (70 %) byla očkována vakcínou mRNA-1273. Plné očkování znamenalo 2 dávky mRNA vakcíny (mRNA-1273 nebo BNT162b2) nebo 1 dávku vektorové vakcíny Ad26.COV2-S (Aslam S. et al., 2021). Naproti tomu v rozsáhlé studii ze Spojeného království s využitím národních registrů analyzující pacienty po orgánových transplantacích nebylo očkování dvěma dávkami ChAdOx1-S nebo mRNA BNT162b2 vakcíny asociováno se snížením rizika SARS-CoV-2 infekce. Na druhou stranu tato studie prokázala u očkováných jedinců 20% redukci rizika úmrtí

(Callaghan C. J. et al., 2022). Tak významný rozdíl v prokázané efektivitě vakcín v prevenci infekce v rámci těchto studií může být vysvětlen různým sledovaným obdobím, kdy druhá studie analyzovala účinnost vakcín v delším časovém horizontu od varianty *Alpha*, navíc s již dominující variantou *Delta*. A právě nižší účinnost dvou dávek BNT162b2 vakcíny proti symptomatice infekci variantou *Delta* oproti variantě *Alpha* (88 % vs. 93,7 %) byla pozorována taktéž v obecné populaci (Lopez Bernal J. et al., 2021). Výsledek mohl být také ovlivněn prodlouženým očkovacím intervalem mezi mRNA vakcínami ve Spojeném království s mediánem až 77 dní (Callaghan C. J. et al., 2022). Ačkoliv tyto studie probíhaly v období před variantou *Omicron*, lze v případě této varianty předpokládat ještě nižší účinnost vakcín, podobně jako v obecné populaci (Wu N. et al., 2023).

Data týkající se efektivity jednotlivých typů vakcín v transplantované populaci jsou nekonzistentní. Callaghan et al. prokázal signifikantní snížení rizika úmrtí očkováním dvěma dávkami vektorové vakcíny ChAdOx1-S v období výskytu variant *Alpha* až *Delta*, na rozdíl od očkování mRNA vakcínou BNT162b2, které nebylo asociováno s redukcí rizika úmrtí (Callaghan C. J. et al., 2022). Oproti tomu ve studii jiných britských autorů, srovnávající očkování dvěma dávkami BNT162b2 a ChAdOx1-S v období dominující varianty *Delta*, bylo očkování mRNA vakcínami spojeno s nižší incidencí infekcí, hospitalizací a úmrtí asociovaných s covidem-19 (OpenSAFELY Collaborative, 2023). Vyšší efektivita BNT162b2 oproti ChAdOx1 v prevenci symptomatice infekce variantou *Delta* byla rovněž prokázána v obecné populaci (88 % vs. 67 %) (Lopez Bernal J. et al., 2023). V dalším období výše zmíněné studie po aplikaci první posilovací dávky mRNA vakcíny (celkem 3. dávky), během dominující varianty *Omicron*, nebyly pozorovány významné rozdíly mezi skupinou iniciálně očkovanou vektorovou nebo mRNA vakcínou v žádné ze sledovaných událostí (OpenSAFELY Collaborative, 2023).

2.5 Léčba covidu-19

Princip léčby covidu-19 vychází z patogeneze onemocnění, tedy z iniciálně virové replikace, která může následně vést k nadměrné a dysregulované imunitní odpovědi hostitele. V časně fázi nemoci jsou účinná cílená antivirotika, v pozdní fázi nemoci protizánětlivá nebo imunosupresivní léčba (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024).

Podle doporučení National Institutes of Health je pro dospělé pacienty bez nutnosti hospitalizace, ale ve vysokém riziku progresu do závažného stavu, tedy i pacienty po

orgánových transplantacích, doporučena léčba jedním ze tří antivirotik. V pořadí první doporučené kombinované antivirotikum nirmatrelvir/ritonavir však není u pacientů po transplantaci ledviny v naší praxi rutinně užíváno, jelikož je ritonavir potentní inhibitor cytochromu P450, přes který jsou metabolizovány kalcineurinové a mTOR inhibitory. Druhým doporučeným přípravkem je remdesivir, jehož aplikace v prvním týdnu od vzniku symptomů snížila riziko hospitalizace nebo úmrtí o 87 % ve srovnání s placebem (Gottlieb R. L. et al., 2022). Alternativou prvních dvou zmíněných preparátů je antivirotikum molnupiravir. V případě léčby již očkovaných jedinců minimálně třemi dávkami vakcíny v době dominující varianty *Omicron* sice molnupiravir zkrátil dobu do zotavení, ale nebyl pozorován efekt z hlediska snížení rizika hospitalizace či úmrtí (Butler C. C. et al., 2023).

U hospitalizovaných imunosuprimovaných pacientů bez, nebo s konvenční oxygenoterapií (tj. vyjma vysokoprůtokové aplikace kyslíku, neinvazivní ventilace, mechanické ventilace nebo extrakorporální membránové oxygenace), připadá do úvahy léčba remdesivirem nebo kombinací s dexamethasonem. U imunosuprimovaných nemocných hospitalizovaných z důvodu covidu-19 snížil remdesivir riziko 28denní mortality o 25 % (Mozaffari E. et al., 2023). Signifikantní zlepšení přežití bylo pozorováno napříč všemi klinicky významnými variantami tzv. VOCs včetně varianty *Omicron*. Dexamethason u pacientů s nutností oxygenoterapie snížil 28denní mortalitu v porovnání se standardní léčbou o 17 % (RECOVERY Collaborative Group, 2021).

V případě jedinců s vyšší kyslíkovou potřebou nebo v případě progresu respirační insuficience a systémové inflamace se léčba dexamethasonem rozšiřuje o jeden z imunomodulátorů (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024). Preferovaným je selektivní inhibitor JAK1/2 baricitinib, případně inhibitor IL-6 receptoru tocilizumab. Inhibicí JAK1/2 dochází k potlačení signálních drah účastnících se imunitní a inflamatorní odpovědi. IL-6 je prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými buňkami imunitního systému, který významně potencuje cytokinovou bouři a spolu s TNF- α je jeho hladina signifikantním prediktorem závažnosti onemocnění a úmrtí (Del Valle D. M. et al., 2020). Eiteliální produkce IL-6 se uplatňuje v patogenezi poškození plic, jelikož indukcí transkripce koagulačních faktorů v játrech a tkáňového faktoru v endotelu potencuje prokoagulační stav typický pro covid-19 (Lamers M. M., Haagmans B. L., 2022).

U pacientů po transplantaci ledviny je součástí léčby covidu-19 i úprava chronické imunosupresivní terapie, ale vždy po individuálním zvážení rizika rejekce vůči riziku progresu onemocnění. V léčbě kortikoidy se standardně pokračuje. V případě léčby závažných stavů,

kdy jsou indikovány imunomodulátory (baricitinib, tocilizumab), je potřeba u již tak imunosuprimovaných nemocných zvážit i rizika sekundárních infekčních komplikací (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024).

2.6 Diagnostika infekce SARS-CoV-2

Diagnostika infekce SARS-CoV-2 spočívá v přímém průkazu viru. K diagnostice se využívají buď testy založené na amplifikaci a detekci ribonukleové kyseliny (NAAT - nucleic acid amplification test), které jsou vysoce senzitivní, nebo antigenní testy detekující přítomnost specifického virového proteinu. Nejčastěji používanou metodou amplifikačních testů je PCR (polymerase chain reaction). Vzorky pro přímou detekci viru mohou být získávány z nazálního nebo nazofaryngeálního výtěru, v případě NAAT také z orofaryngeálního výtěru, ze sputa nebo slin (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).

Úskalí vysoké senzitivity NAAT spočívá v mnohdy problematickém rozlišení aktivní infekce od prolongované perzistence neviabilního viru v těle. Do určité míry se lze orientovat na základě hodnoty Ct (počet amplifikačních cyklů nutných pro detekci genetického materiálu), jelikož při hodnotě $Ct \geq 34$ nebyl prokázán cytopatický efekt viru po jeho inokulaci do buněčné kultury (La Scola B. et al., 2020). Na druhou stranu u pacientů po transplantaci ledviny byl detekován viabilní virus i při nižší virové náloži ($Ct \geq 35$) a to až 38 dnů od nástupu symptomů (Benotmane I. et al., 2021). Protože vyšší hodnota Ct představuje vyšší počet cyklů amplifikace nutných pro detekci genetického materiálu, a tudíž nižší koncentraci virové RNA, může se jednat o časnou infekci, proto je nutné interpretovat Ct hodnotu v korelaci s klinickým stavem.

Známkou prodělané nákazy je i přítomnost SARS-CoV-2 specifických protilátek. Podle současných doporučení (Centers for Disease Control and Prevention, 2024) by se však sérologické testy neměly využívat k diagnostice SARS-CoV-2 infekce vzhledem k diagnostickému oknu, kdy nemusí být tyto protilátky detekovány. Nepřímý průkaz viru na základě testování protilátek však může být přínosný v průkazu infekce u nemocných s jasnými klinickými známkami onemocnění, ale falešně negativními PCR testy. Nicméně v době, kdy je většina populace proočkována, je tento přístup problematický.

2.7 Testování protilátkové a buněčné imunitní odpovědi

Testy na protilátky proti SARS-CoV-2 jsou založeny na principech chemiluminiscenční analýzy (CLIA), enzymové imunoanalýzy (ELISA), na principu laterálního toku (LFIA) nebo nepřímé imunofluorescenční analýzy (IFA), přičemž nejčastěji využívanými jsou první tři

zmíněné. Na principu laterálního toku fungují tzv. rychlé testy, které jsou na rozdíl od ostatních jmenovaných kvalitativní a oproti ELISA a CLIA mají nižší senzitivitu (Gong F. et al., 2021). Dalším typem protilátkového testu je virus-neutralizační test, který stanovuje, zda jsou v séru přítomny neutralizační protilátky schopné inhibovat růst viru na buněčné kultuře.

K testování buněčné imunity jsou využívány testy založené na detekci cytokinů produkovaných T-lymfocyty po stimulaci specifickými antigeny. Dominantními jsou cytokiny IFN- γ a IL-2, a to jak v akutní fázi onemocnění, tak během rekonvalescence (Rydyznski Moderbacher C. et al., 2020, Zuo J. et al., 2021).

3. Hypotéza

Onemocnění covid-19 představuje závažné riziko pro pacienty po transplantaci ledviny z hlediska závažnosti průběhu a mortality. Příčinou je nejspíše kombinace imunosupresivní léčby, přidružená onemocnění a imunitní dysfunkce plynoucí z chronického onemocnění ledvin. Vzhledem k vysoké mortalitě lze předpokládat nedostatečnou imunitní odpověď nejen na infekci virem SARS-CoV-2, ale také na očkování proti SARS-CoV-2. Předpokládáme, že analýzou postinfekční a postvakcinační imunitní odpovědi a jejich determinant můžeme porozumět příčinám horších výsledků ve srovnání s obecnou populací a identifikovat nejrizikovější skupiny pacientů, kteří by mohli profitovat z implementace zjištěných poznatků do klinické praxe. Důležitým aspektem je také reálná účinnost vakcín proti SARS-CoV-2 v transplantované populaci. Domníváme se, že kombinací těchto poznatků můžeme zlepšit prevenci covidu-19.

4. Cíle práce

1. Analýza humorální imunitní odpovědi po přirozené infekci virem SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny a její srovnání s imunokompetentní populací. Identifikace faktorů ovlivňujících tvorbu postinfekčních protilátek.
2. Analýza humorální a buněčné imunitní odpovědi po očkování proti SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny. Identifikace faktorů ovlivňujících imunitní odpověď po vakcinaci. Stanovení funkce štěpu po očkování.
3. Analýza vlivu syndromu geriatrické křehkosti (anglicky frailty) na humorální odpověď po očkování proti SARS-CoV-2.
4. Stanovení reálné účinnosti vakcín proti SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny.

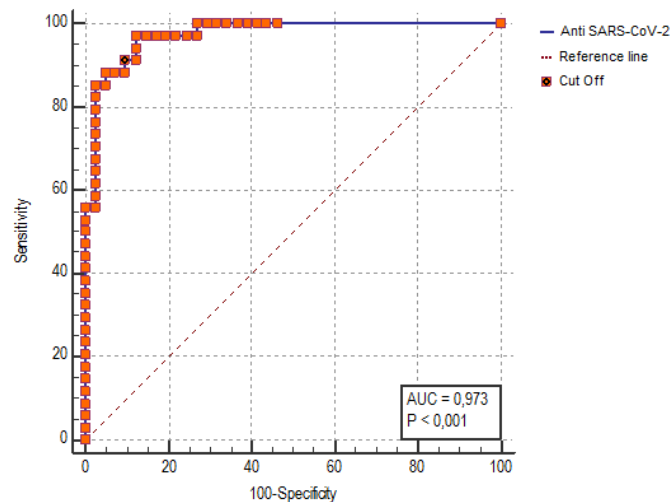
5. Metodika

5.1 Populace

Do studií byli zařazeni pacienti po transplantaci ledviny sledovaní v transplantačním centru IKEM. Podrobný popis studijních kohort je dále uveden v rámci diskutovaných publikací.

5.2 Analýza humorální imunity

V rámci analýzy humorální imunity jsme u studovaných subjektů měřili anti-SARS-CoV-2 IgG protilátky proti spike proteinu. Využili jsme k tomu analyzátor LIAISON® (LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG test, DiaSorin S.p.A.), který pracuje na principu chemiluminiscenční analýzy s paramagnetickými mikročásticemi potaženými proteiny S1 a S2 viru SARS-CoV-2. Na základě dříve publikovaných metodických postupů (Bonelli F. et al., 2020, National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group, 2020) byly k validaci metody použity vzorky získané od 41 subjektů ještě před pandemií covidu-19 a od 34 pacientů s PCR verifikovanou SARS-CoV-2 infekcí. Použitím statistického softwaru MedCalc verze 19.1 byla stanovena optimální hodnota cut-off (9,5 AU/ml) se senzitivitou testu 91,2 % (95% CI 76,3–98,1) a specificitou testu 90,2 % (95% CI 76,9–97,3) (obr. 3).



Obr. 3 ROC křivka pro použitou metodu měření anti-SARS-CoV-2 protilátek.

5.3 Analýza buněčné imunity

Analýza buněčné imunity byla provedena použitím testu založeného na měření interferonu gamma (IFN- γ) uvolněného antigen-specifickými T-buňkami (Interferon Gamma Release

Assay; IGRA), které byly přes noc stimulovány specifickými peptidy viru SARS-CoV-2. V prvním kroku bylo 500 µl plné krve rozpipetováno do tří zkumavek s obsahem kultivačního média RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640), 1% glutaminu, 1% streptomycinu, 1% penicilinu a s obsahem teplem inaktivovaného 10% fetálního bovinního séra. Pozitivní kontrolu představovala zkumavka s obsahem stimulačně působícího fytohemaglutininu (25 ng/ml) (Sigma-Aldrich), negativní kontrolu zkumavka bez stimulačních látek. Pro specifickou stimulaci byly použity peptidy s obsahem epitopů spike proteinu, nukleoproteinu, proteinu ORF3a a 7a (0,8 µg/ml) (Mabtech AB). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. K měření plasmatických hladin IFN-γ (IU/ml) jsme použili analyzátor LIAISON® (LIAISON® QuantiFERON® TB Gold Plus test, DiaSorin S.p.A.). K validaci metody byly použity vzorky plné krve od zdravých dobrovolníků (n = 69), vzorky od subjektů bez anamnézy infekce SARS-CoV-2 (n = 19) a vzorky od jedinců po prodělané infekci virem SARS-CoV-2 nebo po vakcinaci 2 dávkami mRNA vakcíny BNT162b2 (n = 50). Použitím statistického softwaru MedCalc verze 19.1 byla stanovena optimální hodnota cut-off (0,15 IU/ml) se senzitivitou testu 92 % (95% CI 80,8–97,8) a specificitou testu 100 % (95% CI 82,4–100).

5.4 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování dat byly použity statistické softwary SPSS verze 22.0 a 24 (IBM Corp, Armonk, NY), Rstudio verze 1.2.5019, 4.1.1 a 4.0.3. (2020-10-10) (Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA) a k optimalizaci metod pro měření anti-SARS-CoV-2 protilátek a T-buněčné odpovědi statistický software MedCalc verze 19.1.

Detailní popis použitých statistických metod je uveden v příložených publikacích.

6. Publikované výsledky vztahující se k tématu disertační práce

6.1 Protilátková odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci SARS-CoV-2

6.1.1 Úvod

V počátcích pandemie onemocnění covid-19 bylo publikováno jen málo dat týkajících se imunitní odpovědi pacientů po transplantaci ledviny. Přitom jsou tyto pacienti jednou z nejrizikovějších skupin z hlediska mortality na covid-19. Cílem této studie byla analýza séroprevalence a humorální odpovědi pacientů po transplantaci ledviny na infekci virem SARS-CoV-2 a její srovnání s obecnou populací.

6.1.2 Metodika

Jednalo se o jednocentrovou prospektivní observační studii probíhající na podzim roku 2020 během druhé vlny pandemie covidu-19, do které bylo zařazeno celkem 1 037 pacientů po transplantaci ledviny a 512 zdravotníků z transplantačního centra IKEM, kteří představovali kontrolní skupinu. Hlavními cíli studie bylo stanovení séroprevalence SARS-CoV-2 IgG protilátek v obou skupinách a faktorů ovlivňujících protilátkovou odpověď na infekci SARS-CoV-2.

Měřeny byly IgG protilátky proti spike proteinu využitím chemiluminiscenční analýzy s optimální cut-off hodnotou 9,5 AU/ml (viz 5. kapitola – analýza humorální imunity). Vyšetření protilátek bylo nabídnuto všem pacientům po transplantaci ledviny a pracovníkům, bez ohledu na přítomnost symptomů či potvrzenou nákazu. U studijních subjektů s prodělanou nákazou byly retrospektivně zjištěny symptomy a klinický obraz onemocnění, které byly následně klasifikovány dle závažnosti nemoci (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024). Ke stanovení asociace mezi anti-SARS-CoV-2 protilátkami a dalšími proměnnými jsme zkonstruovali několik lineárních regresních modelů.

6.1.3 Výsledky

Séroprevalence ve sledovaném období byla nižší u pacientů po transplantaci ledviny než u zdravotníků (6,8 % vs. 11,9 %, $p = 0,001$), a to i v případě analýzy pouze asymptomatických jedinců (5,01 % vs. 8,35 %, $p = 0,012$).

Pacienti po transplantaci ledviny, kteří prodělali infekci SARS-CoV-2, byli mladší ($p = 0,001$) a byli častěji léčeni kalcineurinovými inhibitory ($p = 0,029$). Séropozitivní pacienti,

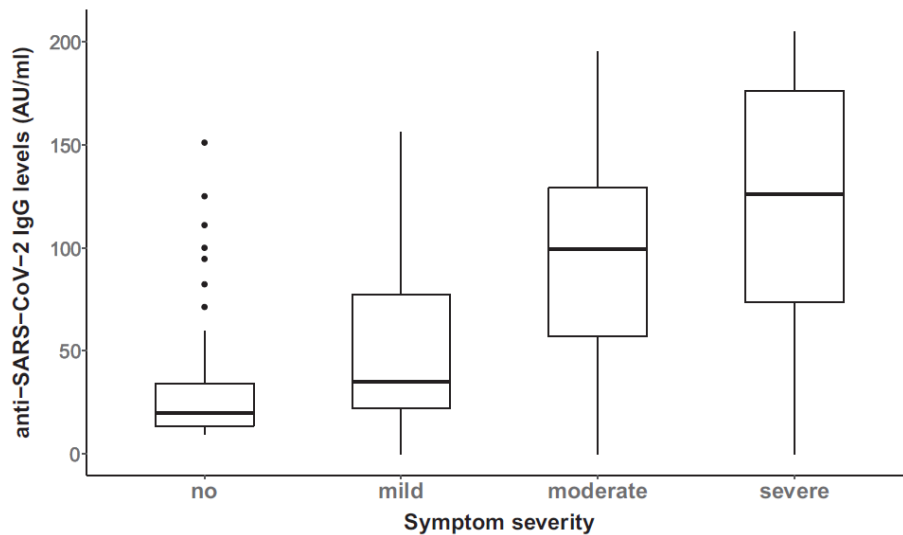
kteří prodělali symptomatický covid-19, měli vyšší BMI ($p = 0,04$) a tvořili vyšší hladiny anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek ($p < 0,001$) než jedinci po asymptomatické infekci.

Ze všech jedinců, kteří prodělali symptomatickou SARS-CoV-2 infekci verifikovanou PCR testem, došlo k sérokonverzi u 82,6 % pacientů po transplantaci ledviny a 95,2 % zdravotníků. Infekce virem SARS-CoV-2 indukovala tvorbu protilátek v signifikantně vyšších hladinách ve skupině pacientů po transplantaci ledviny oproti zdravotníkům (medián 31 AU/ml, IQR 17–84 vs. medián 15 AU/ml, IQR 11–39, $p < 0,001$). V rámci symptomatických subjektů neměla doba mezi diagnózou infekce a odběrem protilátek vliv na jejich hladiny ($\beta = 0,58$, 95% CI 0,091–1,26, $p = 0,089$). U pacientů po transplantaci se závažnějším průběhem onemocnění byla pozorována vyšší hladina protilátek (obr. 4).

Jedinými faktory signifikantně ovlivňujícími tvorbu protilátek v rámci všech studovaných subjektů (pacientů po transplantaci a zdravotníků) byly v multivariabilní analýze symptomatický průběh covidu-19 ($\beta = 19,57$, 95% CI 7,98–31,16, $p = 0,001$) a středně závažné až závažné symptomy ($\beta = 57,11$, 95% CI 37,41–76,8, $p < 0,001$). Tyto vykazovaly vysokou kolinearitu s příznaky z postižení dolních dýchacích cest. Stejně tak byla v multivariabilní analýze přítomnost středně závažných až závažných symptomů jediným nezávislým faktorem asociovaným s hladinou protilátek v populaci symptomatických pacientů po transplantaci ledviny ($\beta = 41,99$, 95% CI 9,92–74,06, $p = 0,011$).

Poněvadž byl závažnější průběh covidu-19 spojen s častější redukcí až úplným vysazením imunosuprese, byl vytvořen alternativní model, ve kterém byla závažnost symptomů nahrazena redukcí imunosupresivní léčby. V multivariabilní analýze byla redukce imunosuprese jediným faktorem majícím vliv na tvorbu anti-SARS-CoV-2 protilátek ($\beta = 44,17$, 95% CI 15,89–72,45, $p = 0,003$). Mykofenolát byl vysazen u 57,9 % pacientů s mírnými symptomy a 81,8 % pacientů se středně závažnými symptomy. U jedinců se závažným onemocněním byla v jeho v průběhu vysazena veškerá imunosuprese.

U malé části pacientů po transplantaci ledviny (22 ze 107) byl k dispozici výsledek druhého sérologického testování k ověření stability protilátek v čase. V době druhého odběru byly protilátky prokázány u 90,9 % pacientů (medián 60,5 dní, IQR 14–91, min. 8 dní, max. 182 dní). Hladina protilátek mezi prvním a druhým měřením se signifikantně nelišila ($p = 0,907$).



Obr. 4 Hladiny anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek měřených u pacientů po transplantaci ledviny stratifikovaných podle závažnosti průběhu onemocnění. Hladiny protilátek se statisticky významně lišily napříč skupinami ($p < 0,001$). Post-hoc analýza prokázala statisticky významné rozdíly mezi skupinami: asymptomatický průběh a mírné symptomy ($p < 0,001$), asymptomatický průběh a středně závažné symptomy ($p < 0,001$), mírné a středně závažné symptomy ($p = 0,023$), středně závažné a závažné symptomy ($p = 0,017$).

6.1.4 Diskuse

Vzhledem k vysoké mortalitě pacientů po transplantaci ledviny na covid-19, několikanásobně převyšující obecnou populaci (Akalin E. et al., 2020), lze u těchto pacientů předpokládat slabší imunitní odpověď na infekci virem SARS-CoV-2. Na začátku pandemie onemocnění covid-19 bylo k dispozici limitované množství dat týkajících se imunitní odpovědi této populace na SARS-CoV-2 infekci a dosud publikované studie byly vesměs séroprevalenční.

Cílem naší studie byla kromě stanovení séroprevalence také analýza faktorů ovlivňujících protilátkovou odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci virem SARS-CoV-2 a srovnání s obecnou populací. K testování jsme zvolili metodu analyzující anti-spike IgG protilátky, nakolik je receptorová vazebná doména S proteinu vysoce imunogenní oblast (Piccoli L. et al., 2020) a zvláště u této kohorty senzitivnější, než testy detekující antinukleokapsidové protilátky (Predecki M. et al., 2020).

Oproti obecné populaci byla séroprevalence mezi pacienty po transplantaci ledviny téměř poloviční. Ačkoliv mohl být výsledek ovlivněn větší tendencí k dobrovolnému testování u jedinců, kteří si byli vědomi překonané nákazy, podobný trend byl pozorován i v případě

analýzy asymptomatických subjektů. Jedním z vysvětlení je nižší míra sérokonverze po infekci u imunokompromitovaných jedinců. Dalším možným vysvětlením je na jedné straně důsledné používání ochranných pomůcek a samoizolace transplantovaných pacientů, na druhé straně vyšší expozice nákaze ve skupině zdravotníků. Pro porovnání, ve studii z londýnské univerzity byla séroprevalence v populaci transplantovaných pacientů až 10,4 % (Predecki M. et al., 2020) oproti 6,8% séroprevalenci v našem centru, přitom kumulativní počet potvrzených případů infekce byl na konci definovaných studijních období mnohem vyšší v České republice než ve Spojeném království (Johns Hopkins University & Medicine, Coronavirus Resource Center).

Protilátky po symptomatické SARS-CoV-2 infekci vytvořilo až 82,6 % pacientů po transplantaci ledviny. Míra sérokonverze tedy není tak nízká, jak by se dalo očekávat u imunokompromitovaných jedinců. Například u hemodialyzovaných pacientů byla sérokonverze po infekci pozorována v 89 % případů (Sakhi H. et al., 2021).

Vyšší věk je významným rizikovým faktorem závažného průběhu covidu-19 (Merad M. et al., 2022). V našem souboru nebyl pozorován signifikantní věkový rozdíl mezi pacienty po symptomatickém covidu-19 a po asymptomatické nákaze. Naopak pacienti, u kterých jsme prokázali dřívější nákazu, byli mladší než pacienti bez anamnézy covidu-19. To by mohlo být částečně vysvětleno menší obavou z nemoci u mladších jedinců a tudíž i menší mírou ochrany ve srovnání se staršími pacienty. Jedinci se symptomatickou infekcí však vytvořili signifikantně vyšší hladiny protilátek a měli vyšší BMI oproti asymptomatickým pacientům. Obezita je známým rizikovým faktorem závažného covidu-19 (Merad M. et al., 2022).

Překvapivě jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny postinfekčních protilátek u pacientů po transplantaci ledviny než u zdravotníků. Protože v kohortě transplantovaných pacientů byl daleko častější symptomatický a závažný průběh nemoci, analyzovali jsme dále vliv přítomnosti a závažnosti symptomů na tvorbu protilátek. Zjistili jsme, že jedinými faktory nezávisle asociovanými s hladinou protilátek v obou skupinách je právě symptomatické onemocnění a přítomnost středně závažných až závažných symptomů, tedy symptomů spojených s postižením dolních cest dýchacích. Navíc jsme ukázali, že pacienti po transplantaci se závažnějším průběhem tvoří vyšší hladiny protilátek než pacienti s mírným nebo asymptomatickým průběhem onemocnění. Tento jev byl dosud pozorován jen v obecné populaci (Dan J. M. et al., 2021).

V rámci analýzy faktorů, které ovlivňují tvorbu postinfekčních protilátek u symptomatických pacientů po transplantaci ledviny, včetně těch týkajících se transplantace

(funkce štěpu v době odběru protilátek, proteinurie, konkrétní imunosupresivní léčba, senzitivace), byla opět jediným signifikantním faktorem přítomnost středně závažných až závažných symptomů. Se stoupající závažností covidu-19 však v klinické praxi docházelo k daleko častější redukci imunosuprese, zejména mykofenolát mofetilu, eventuálně k úplnému vysazení imunosuprese. Vzhledem k závislosti těchto dvou proměnných jsme vytvořili alternativní model, ve kterém jsme závažnost symptomů nahradili redukcí imunosuprese. V multivariabilní analýze bylo vysazení jakékoliv imunosuprese jako jediné významně spojeno s vyšší tvorbou protilátek po SARS-CoV-2 infekci. Negativní vliv imunosuprese na tvorbu protilátek u pacientů po orgánových transplantacích, konkrétně antimetabolitu mykofenolát mofetilu, byl již dříve prokázán ve studii analyzující odpověď na očkování proti viru chřipky (Baluch A. et al., 2013), ale také na první dávku mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 (Boyarsky B. J. et al., 2021).

Limitací studie je nabídnutí sérologického testování všem pacientům a zdravotníkům, což mohlo vést k vyššímu záchytu jedinců s prodělaným onemocněním. Možný zájem o znalost sérostatusu tak mohl ovlivnit výsledek séroprevalence. Rovněž nebylo možné posoudit, zda doba mezi diagnózou infekce a odběrem měla vliv na tvorbu protilátek, jelikož velká část séropozitivních jedinců měla asymptomatický průběh. Avšak u symptomatických pacientů vliv neměla. V neposlední řadě tato studie analyzovala pouze humorální složku adaptivní imunity.

Závěr

Navzdory imunosupresivní léčbě je humorální odpověď pacientů po transplantaci ledviny po infekci virem SARS-CoV-2 významná, přičemž hladiny protilátek jsou závislé na závažnosti symptomů. Vzhledem k zachované postinfekční humorální odpovědi je možné, že i následnou vakcinací indukovaná imunitní odpověď nemusí být tak slabá, jak by se dalo u této kohorty pacientů očekávat.

Článek byl publikován v časopise American Journal of Transplantation

Humoral response to SARS-CoV-2 is well preserved and symptom dependent in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2021 Dec;21(12):3926-3935.

Kompletní článek je přiložen v anglickém jazyce.

Humoral response to SARS-CoV-2 is well preserved and symptom dependent in kidney transplant recipients

Maria Magicova¹ | Martina Fialova² | Ivan Zahradka¹ |
Silvie Rajnochova-Bloudickova¹ | David Hackajlo³ | Petr Raska³ |
Ilja Striz² | Ondrej Viklicky¹

¹Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Department of Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³Department of Informatics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Correspondence

Ondrej Viklicky, Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.
Email: ondrej.viklicky@ikem.cz

Funding information

Ministerstvo Zdravotnictví České Republiky, Grant/Award Number: NV19-06-00031

Data on the immune response to SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients are scarce. Thus, we conducted a single-center observational study to assess the anti-SARS-CoV-2 IgG seroprevalence in outpatient kidney transplant recipients (KTR; $n = 1037$) and healthcare workers (HCW; $n = 512$) during the second wave of the COVID-19 pandemic in fall 2020 and evaluated the clinical variables affecting antibody levels. Antibodies against S1 and S2 subunit of SARS-CoV-2 were evaluated using immunochemiluminescent assay (cut off 9.5 AU/ml, sensitivity of 91.2% and specificity of 90.2%). Anti-SARS-CoV-2 IgG seroprevalence was lower in KTR than in HCW (7% vs. 11.9%, $p = .001$). Kidney transplant recipients with SARS-CoV-2 infection were younger ($p = .001$) and received CNI-based immunosuppression more frequently ($p = .029$) than seronegative KTR. Anti-SARS-CoV-2 IgG positive symptomatic KTR had a higher BMI ($p = .04$) than asymptomatic KTR. Interestingly, anti-SARS-CoV-2 IgG levels were higher in KTR than in HCW (median 31 AU/ml, IQR 17–84 vs. median 15 AU/ml, IQR 11–39, $p < .001$). The presence of moderate to severe symptoms in KTR was found to be the only independent factor affecting IgG levels (Beta coefficient = 41.99, 95% CI 9.92–74.06, $p = .011$) in the multivariable model. In conclusion, KTR exhibit a well-preserved symptom-dependent humoral response to SARS-CoV-2 infection.

KEYWORDS

clinical research/practice, infection and infectious agents – viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology, patient characteristics

1 | INTRODUCTION

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) global pandemic has hit the virus-naïve population of the Czech Republic severely in fall 2020. As a consequence, a significant proportion of KTR and HCW were infected. Kidney transplant recipients and

chronic kidney disease stage 5 patients represent the most vulnerable populations in the recent SARS-CoV-2 pandemic with corresponding morbidity and mortality significantly exceeding general population,¹ and case fatality ratio of 24% in hospital admitted patients.² Altered immune response to SARS-CoV-2 in immunosuppressed individuals is therefore anticipated, however, data on the immune response to

Abbreviations: Ab test, antibody test; ATG, anti-thymocyte globulin; AZA, azathioprine; BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; COVID-19, coronavirus disease 2019; CyA, cyclosporin A; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HCW, healthcare worker; IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile range; KTR, kidney transplant recipient; MMF, mycophenolate mofetil; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; PRA, panel reactive antibodies; rATG, rabbit anti-thymocyte globulin; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; S protein, spike protein; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; s-creatinine, serum creatinine; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences.

© 2021 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients are scarce. Analysis of a smaller Berlin outpatient cohort showed a low seroprevalence during the first COVID-19 outbreak peak in spring 2020.³ Investigation of sera from 855 KTR from Imperial College in June 2020 for the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG using different assays revealed seroprevalence to be as high as 10.4%. This study pointed out the different sensitivity of commercially available tests and the importance of used target antigens in serologic assays and showed the receptor-binding domain to outperform nucleocapsid protein in the detection of SARS-CoV-2 seroprevalence in kidney transplant recipients.⁴ The receptor-binding domain is found within the S1 subunit of trimeric transmembrane glycoprotein S (spike) protein of SARS-CoV-2, while the S2 subunit is involved in the fusion between the viral envelope and cellular membranes upon attachment.⁵ Recently, several high-throughput solid-phase immunoassays have been shown to be suitable for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in the population.⁶

Herein, we report on a large single-center study conducted in the fall of 2020, during the second peak of the outbreak. A total of 1037 KTR and 512 HCW have taken part in the study. The main aims were to assess the seroprevalence of SARS-CoV-2 IgG antibodies among KTR and HCW and to identify the factors associated with the antibody levels. Using chemiluminescent assay with S1 and S2 antigens we show, that KTR exhibit similarly increasing SARS-CoV-2 IgG antibody seroprevalence as HCW. Moreover, KTR forms similar levels of anti-spike protein antibodies in relation to disease severity as immunosuppression-naïve controls.

2 | METHODS

2.1 | Study population

This is a single-center prospective observational study of 1037 KTR and 512 HCW in whom SARS-CoV-2 antibodies concentrations were screened during the second peak of the COVID-19 pandemic in the fall of 2020, between October 1 and November 30, 2020. Serologic testing was offered to all KTR with regular out-patient visits and HCW regardless of previous symptoms or SARS-CoV-2 PCR positivity. All KTR who accepted the invitation were eligible to participate in the study. To study effects of previously known SARS-CoV-2 infection on IgG antibody levels in kidney transplantation, KTR cohort was enriched by additional 35 subjects who experienced symptomatic SARS-CoV-2 infection with known SARS-CoV-2 antibodies concentrations measured outside the screening period (Figure 1). The median age of HCW controls was 44 years (IQR 36–52), most of them were women (406, 79%). KTR and transplant demography used for further analyses is given in Tables 1 and 2.

SARS-CoV-2 infection was defined either by detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-PCR in nasopharyngeal swab samples in symptomatic or asymptomatic cases. Similarly, the presence of SARS-CoV-2 IgG antibodies in asymptomatic or oligosymptomatic cases was considered as SARS-CoV-2 infection as well.

A questionnaire regarding symptoms was retrospectively filled out by both KTR and HCW after the symptomatic course of the disease. KTR were contacted by the transplant coordinators and HCW by the hospital epidemiology department, respectively. The questionnaire included the presence of pneumonia diagnosed by an imaging technique, dyspnea, need for oxygen therapy, spontaneous saturation below 94%, cough, cold, sore throat, arthralgia, myalgia, muscle weakness, fatigue, loss of smell, loss of taste, headache, dyspepsia, fever, and loss of weight.

The severity of symptoms was scored for each symptomatic KTR and HCW according to the Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection definition.⁷

Both KTR and HCW signed written informed consent to participate in the study and the Ethical board approved this study under No: G2107.

2.2 | SARS-CoV-2-specific antibodies detection

Study subjects were tested for SARS-CoV-2-specific antibodies using LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG chemiluminescence immunoassay (DiaSorin S.p.A.). This assay contains paramagnetic microparticles coated with spike proteins S1 and S2. According to previously published methodological procedures concerning the measurement methods,^{8,9} the method was validated using stored frozen samples obtained from subjects before the SARS-CoV-2 pandemic ($n = 41$) and from patients with SARS-CoV-2 infection verified by RT-PCR ($n = 34$). The optimized cut off (9.5 arbitrary units (AU/ml) with test sensitivity 91.2% (95% CI 76.3–98.1) and specificity 90.2% (95% CI 76.9–97.3) was determined using MedCalc Statistical Software version 19.1 (Figure S1).

2.3 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 22.0 (IBM Corp), R-studio version 1.2.5019 (Development for R. RStudio, Inc.) and MedCalc Statistical Software version 19.1. The normality of data distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. Since the majority of the data did not fit the normal distribution, only non-parametric statistical methods were used. The Mann–Whitney U or Kruskal–Wallis tests were used for the comparison of continuous variables. Pearson's chi-squared test or Fischer's exact test were used to compare categorical variables. Descriptive statistics are reported as medians and interquartile ranges (IQR) for continuous variables and numbers and percentages for categorical variables.

Several multivariable linear regression models were used to assess the association between IgG levels and selected independent variables.

First, the impact of general factors on anti-SARS-CoV-2 IgG levels among all subjects with prior SARS-CoV-2 infection was evaluated. Since this analysis was done in the entire cohort of subjects with past SARS-CoV-2 infection (i.e., both HCW and KTR),

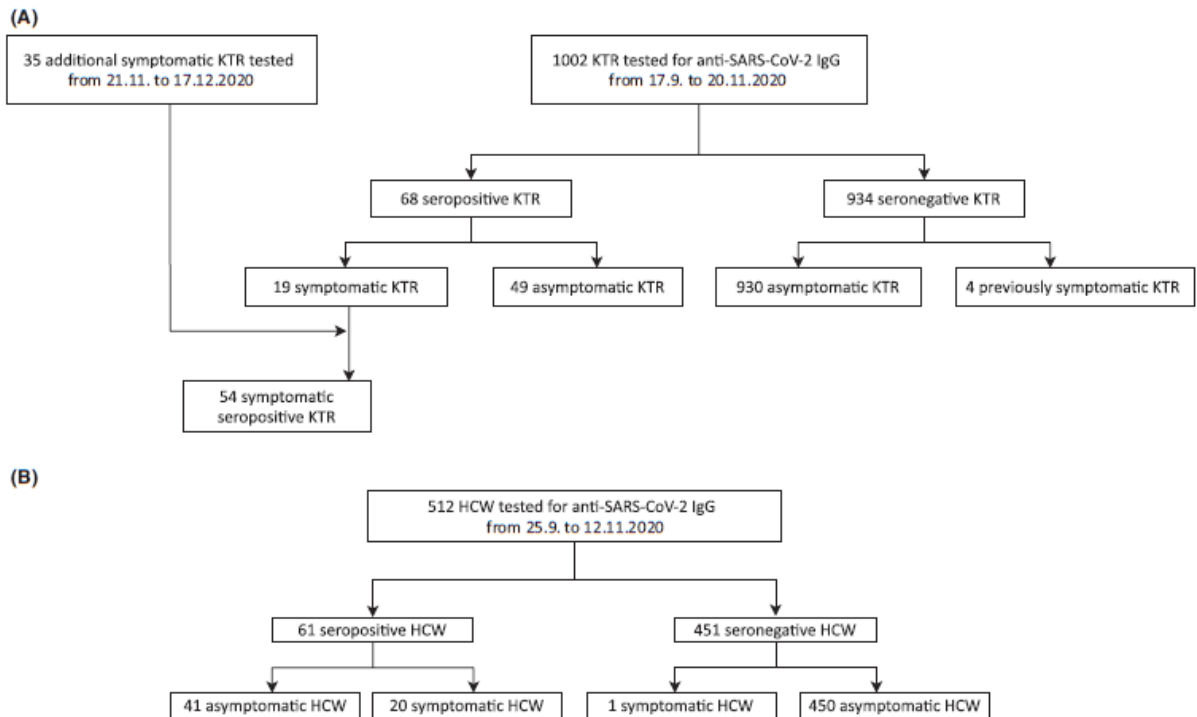


FIGURE 1 Study flow chart. (A) A total of 1002 kidney transplant recipients (KTR) were tested for anti-SARS-CoV-2 IgG from September 17 to November 11. A total of 68 KTR were anti-SARS-CoV-2 IgG positive and 934 KTR were anti-SARS-CoV-2 IgG negative. Out of 68 KTR, 19 KTR recalled symptoms of SARS-CoV-2 infection whereas 49 KTR were asymptomatic. To study effects of previously known SARS-CoV-2 infection on anti-SARS-CoV-2 IgG levels in kidney transplantation, KTR cohort was enriched by additional 35 KTR who experienced symptomatic SARS-CoV-2 infection with known anti-SARS-CoV-2 antibodies concentrations measured from November 21 to December 17. Out of 934 seronegative KTR, 930 were asymptomatic and 4 KTR experienced symptomatic SARS-CoV-2 infection which was confirmed by SARS-CoV-2 RNA positivity in nasopharyngeal swab. (B) Altogether 512 healthcare workers (HCW) were tested for anti-SARS-CoV-2 IgG during defined study period. Sixty-one HCW anti-SARS-CoV-2 IgG positive (41 asymptomatic and 20 symptomatic). A total of 451 HCW were anti-SARS-CoV-2 IgG negative in whom one healthcare worker experienced symptoms associated with SARS-CoV-2 infection and was later tested positive for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swab

transplant-related variables could not be assessed in this model and only general factors were analyzed (Table 3).

Second, the associations of clinical symptoms and transplant variables with anti-SARS-CoV-2 IgG levels among previously symptomatic KTR were analyzed (Table 4, Table S1). Individual clinical symptoms were aggregated into groups reflective of specific organ involvement. The following clinical symptoms were analyzed in the univariable analysis: upper respiratory tract symptoms, lower respiratory tract symptoms, gastrointestinal tract symptoms, flu-like symptoms, headache, loss of smell or taste and presence of moderate to severe symptoms. The presence of lower respiratory tract symptoms and presence of moderate to severe symptoms showed high collinearity, and thus, only the variable of moderate to severe symptoms was chosen to be used in the final model. Transplantation-related variables were eGFR and level of s-creatinine at the time of antibody testing, the use of depletion therapy (rATG, rituximab, alemtuzumab) at the time of transplantation, historical PRA and time from transplantation to the onset of symptoms. General factors considered for the analysis were sex, age, blood type O, and BMI. Immunosuppression related variables

were the baseline use of tacrolimus, cyclosporin A, mycophenolate mofetil or mycophenolic acid, mTOR inhibitor, steroids, calcineurin-based immunosuppression treatment, standard triple-drug treatment (tacrolimus, mycophenolate, steroid) and any triple-drug treatment. Antibody levels can have a time-dependent dynamic. Since only the subgroup of symptomatic KTR (i.e., those who were aware of their SARS-CoV-2 infection) was used to create this model, the time between reported symptom onset and sample collection could be calculated and was also used as a variable in the model.

Next, the effect of immunosuppression withdrawal on SARS-CoV-2 antibody levels was evaluated (Table S2). This model was also done in the subset of previously symptomatic KTR, and the variable selection was similar to the previously described model. Since the presence of more severe symptoms led to more frequent immunosuppression withdrawal, there is a clear causal downstream effect between these two variables, and thus only one of these variables should be used in the same multivariable model. Therefore, symptom severity was substituted by immunosuppression withdrawal in this model in order to evaluate its effect.

TABLE 1 Characteristics of kidney transplant recipients with SARS-CoV-2 infection and seronegative asymptomatic kidney transplant recipients

	Patients with SARS-CoV-2 infection, n = 107	Seronegative asymptomatic patients, n = 930	p value ^a
Male sex - no. (%)	69 (64.5%)	577 (62%)	.621
Age - median (IQR) ^b	51 (40-62)	58 (46-68)	.001
Blood type ^c - no. (%)			
O	22 (21%)	261 (28%)	.183
A	51 (48%)	386 (42%)	
B	25 (23%)	173 (19%)	
AB	7 (7%)	88 (9%)	
BMI - median (IQR)	27.6 (25.2-31.6)	27.5 (24.5-30.8)	.427
BMI ≥ 30 - no. (%)	35 (33%)	283 (30%)	
Antihypertensive medication - no. (%)	100 (93%)	844 (91%)	.354
Diabetes - no. (%)	21 (20%)	243 (26%)	.144
Deceased donor - no. (%)	80 (75%)	743 (80%)	.215
Prior kidney transplant - no. (%)	13 (12%)	112 (12%)	.794
Time from transplantation - median (IQR), years	5.5 (1.8-9.5)	4.9 (1.3-9.8)	.671
PRA max - median (IQR), %	4 (0-25)	7 (2-26)	.835
Serum creatinine ^{d,e} - median (IQR), μmol/L	128 (106-161)	126 (104-165)	.665
Proteinuria ^{d,e} ≥ 1 - no. (%)	15 (14%)	153 (16%)	.479
Immunosuppression use			
Tacrolimus - no. (%)	94 (87.9%)	780 (83.9%)	.284
CyA - no. (%)	11 (10.3%)	80 (8.6%)	.588
CNI - no. (%)	105 (98.1%)	860 (92.5%)	.029
Steroids - no. (%)	93 (86.9%)	837 (90.0%)	.251
MMF/MPA - no. (%)	95 (88.8%)	765 (82.3%)	.089
mTORi - no. (%)	4 (3.7%)	51 (5.5%)	.445
TAC/MMF, MPA/steroids - no. (%)	78 (72.9%)	621 (66.8%)	.201
Depletive induction - no. (%)	46 (43%)	419 (45%)	.372
ATG use within 6 months of symptoms - no. (%)	2 (1.9%)	35 (3.8%)	.419
Rituximab use within 6 months of symptoms - no. (%)	0 (0%)	4 (0.4%)	1.000

Abbreviations: ATG, anti-thymocyte globulin; AZA, azathioprine; BMI, body mass index; CNI-based, calcineurin inhibitor-based; CyA, cyclosporin A; IQR, interquartile range; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; TAC, tacrolimus; PRA, panel reactive antibodies.

Bold was used to mark significant *p* values.

^a *p* values for group comparison based on the Mann-Whitney *U* test for continuous variables, Pearson's chi-squared test or Fischer's exact test for categorical variables, *p* < .05 for significance.

^b IQR - interquartile range (25th percentile to 75th percentile).

^c In 24 kidney transplant recipients blood type was not available in electronic medical records.

^{d,e} Serum creatinine and proteinuria measurements were done on the day of antibody testing.

Finally, a model including all symptomatic subjects (KTR and HCW) was made to assess whether the time from symptom onset to antibody testing plays a role in SARS-CoV-2 antibody levels in the subgroup of all symptomatic subjects (Table S3).

After collinearity diagnostics, variables with *p* < .25 from the univariable analysis were entered into the multivariable linear regression model. Beta coefficients reported in the text refer to the unstandardized linear regression coefficients beta. All tests were performed at the 5% level of significance.

3 | RESULTS

3.1 | Anti-SARS-CoV-2 IgG seroprevalence

Out of 1002 KTR screened for anti-SARS-CoV-2 IgG in a defined time period (Figure 1), 68 (6.8%) KTR were seropositive (Figure 2). The seroprevalence in 61 HCW (11.9%) was significantly higher (*p* = .001) in comparison to KTR. The same trend was observed for the overall prevalence in asymptomatic KTR (5.01%) and asymptomatic HCW (8.35%; *p* = .012).

TABLE 2 Characteristics of seropositive asymptomatic and symptomatic kidney transplant recipients

	Asymptomatic seropositive kidney transplant recipients, n = 49	Symptomatic seropositive kidney transplant recipients, n = 54	p value ^a
Male sex - no. (%)	36 (73.5%)	31 (57%)	.088
Age - median (IQR) ^b	51 (40-59.5)	53 (43-66)	.203
Blood type ^c - no. (%)			
O	13 (27%)	7 (13%)	.331
A	21 (43%)	29 (54%)	
B	10 (20%)	14 (26%)	
AB	3 (6%)	4 (7%)	
BMI - median (IQR)	26 (25-31)	29 (26-33)	.04
BMI ≥ 30 - no. (%)	13 (27%)	21 (39%)	
Antihypertensive medication - no. (%)	45 (92%)	52 (96%)	.335
Diabetes - no. (%)	7 (14%)	14 (26%)	.143
Deceased donor - no. (%)	39 (80%)	38 (70%)	.282
Prior kidney transplant - no. (%)	7 (14%)	6 (11%)	.225
Time from transplantation - median (IQR), years	6.6 (1.8-9.6)	5.2 (1.3-9.5)	.600
PRA max - median (IQR), %	4 (2-22)	5 (026.5)	.694
Serum creatinine ^{d,e} - median (IQR), μmol/L	131 (108-159)	125 (102-165)	.668
Proteinuria ^{d,e} ≥ 1 - no. (%)	6 (12%)	7 (13%)	.902
Anti-SARS-CoV-2 IgG levels - median (IQR), AU/ml	20 (13-35)	59 (28-124)	<.001
Immunosuppression use			
Tacrolimus - no. (%)	43 (87.8%)	47 (87.0%)	.913
CyA - no. (%)	5 (10.2%)	6 (11.1%)	.882
CNI - no. (%)	48 (97.9%)	53 (98.1%)	.945
Steroids - no. (%)	46 (93.8%)	50 (92.6%)	.796
MMF/MPA - no. (%)	41 (83.7%)	50 (92.6%)	.159
mTORi - no. (%)	2 (4.08%)	2 (3.7%)	1.000
TAC/MMF, MPA/steroids no. (%)	34 (69.4%)	40 (74.1%)	.597
Depletive induction - no. (%)	20 (41%)	23 (43%)	.641

Abbreviations: AZA, azathioprine; BMI, body mass index; CNI-based, calcineurin inhibitor-based; CyA, cyclosporin A; IQR, interquartile range; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; TAC, tacrolimus; PRA, panel reactive antibodies.

^a p values for group comparison based on the Mann-Whitney U test for continuous variables, Pearson's chi-squared test or Fischer's exact test for categorical variables, $p < .05$ for significance.

^b IQR - interquartile range (25th percentile to 75th percentile).

^c In two kidney transplant recipients blood type was not available in electronic medical records.

^{d,e} Serum creatinine and proteinuria measurements were done on the day of antibody testing.

When looking at the time-course of anti-SARS-CoV-2 IgG seroconversion rates in KTR during the second wave of the COVID-19 pandemic, the rate of positive samples nearly doubled from 4% of seropositive samples in September 2020 to 6.8% of seropositive samples in November 2020.

Altogether, 107 KTR suffered from SARS-CoV-2 infection, 49 KTR were asymptomatic and in 54 KTR symptoms associated with SARS-CoV-2 infection preceded seroconversion. Only in four symptomatic cases verified by the RT-PCR test, no anti-spike protein antibodies were detected. In total, 930 KTR were asymptomatic and no SARS-CoV-2 antibodies were found. Twenty HCW had symptomatic

SARS-CoV-2 infection confirmed by positive PCR test prior to positive antibody testing. In a single case, no antibodies were detected after RT-PCR positive symptomatic SARS-CoV-2 infection (Figure 1).

3.2 | Characteristics of anti-SARS-CoV-2 IgG positive patients

Demographic and transplant characteristics of KTR with SARS-CoV-2 infection and seronegative asymptomatic KTR are given in Table 1. Kidney transplant recipients who experienced

TABLE 3 Linear model of factors influencing the anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels among KTR and HCW with SARS-CoV-2 infection

Univariable regression		
	Coefficient ^b [95% CI]	p value ^a
Age (years)	1.02 [0.56 to 1.48]	<.001
Symptoms	38.66 [20.67 to 56.65]	<.001
Moderate to severe symptoms	52.04 [36.04 to 68.04]	<.001
Transplantation	27.06 [13.92 to 40.3]	<.001
Sex (male)	9.17 [-4.04 to 22.39]	.172
Multivariable regression		
	Coefficient ^b [95% CI]	p value ^c
Intercept	7.16 [-13.81 to 28.14]	.501
Age (years)	0.3 [-0.15 to 0.74]	.188
Symptoms	19.57 [7.98 to 31.16]	.001
Moderate to severe symptoms	57.11 [37.41 to 76.8]	<.001
Transplantation	9.11 [-4.33 to 22.56]	.183
Sex (male)	2.66 [-9.22 to 14.54]	.659

^ap values based on univariable linear regression, only results of factors included in the final multivariable model are shown, $p < .05$ for significance.

^bCoefficient refers to the unstandardized linear regression coefficient beta.

^cp values based on multivariable linear regression, $p < .05$ for significance.

SARS-CoV-2 were more likely to be younger and treated by CNI-based immunosuppression.

The kidney transplant recipients' clinical characteristics with symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection were also compared. Higher BMI was the only significant difference in KTR with symptomatic SARS-CoV-2 infection. Symptomatic KTR produced anti-SARS-CoV-2 IgG in significantly higher levels than asymptomatic KTR (Table 2).

We also evaluated the durability of SARS-CoV-2 antibodies in a smaller subset of the patients. Twenty-two out of 107 KTR with previous SARS-CoV-2 infection had a follow-up test before the start of the vaccination program. 20 (90.9%) of them had detectable antibodies at the time of the second testing (median 60.5 days, IQR 14–91, minimum 8 days, maximum 182 days). The median level of anti-SARS-CoV-2 IgG in those 22 KTR was 22.05 (IQR 13.65–41.58) at the time of the first antibody test and 30.7 (IQR 12.2–71.93) at the time of the second antibody test ($p = .907$).

3.3 | Variables affecting anti-SARS-CoV-2 IgG levels

Among all subjects with previous SARS-CoV-2 infection (i.e., both KTR and HCW), a significantly higher IgG levels were found in KTR

TABLE 4 Linear model of factors influencing the anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels among symptomatic kidney transplant recipient subgroup

Multivariable regression		
	Coefficient ^b [95% CI]	p value ^a
Intercept	51.99 [-47.21 to 151.18]	.297
Moderate to severe symptoms	41.99 [9.92 to 74.06]	.011
Tacrolimus use at baseline	-10.96 [-54.14 to 32.23]	.612
Mycophenolate use at baseline	-24.43 [-85.54 to 36.68]	.426
Any triple-drug therapy	-16.7 [-65.92 to 32.53]	.499
Age	0.51 [-0.77 to 1.79]	.427
Diabetes mellitus	2.00 [-31.85 to 35.85]	.906
Time from symptom onset to Ab test (days)	0.66 [-0.13 to 1.45]	.102
Sex (male)	0.91 [-25.49 to 27.32]	.945

Abbreviation: Ab test, antibody testing.

^ap values based on multivariable linear regression, $p < .05$ for significance.

^bCoefficient refers to the unstandardized linear regression coefficient beta.

compared to HCW, who served as controls (median 31 AU/ml, IQR 17–84 vs. median 15 AU/ml, IQR 11–39, $p < .001$) (Figure 3).

Since KTR presented with higher anti-SARS-CoV-2 IgG levels, we next investigated the possible link of symptom severity and antibody levels. Out of 58 symptomatic KTR, 38 (65.5%) presented mild, 11 (19%) moderate, and 8 (14%) severe symptoms. Because only one kidney transplant recipient met the criteria for critical illness according to the Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 infection,⁷ the patient was included in the severe illness category, which then consisted of 9 (15.5%) KTR. Kidney transplant recipients with moderate and severe illness had significantly higher antibody levels than those with mild or no symptoms (Figure 4). Among the HCW control group, there was only one recorded case of pneumonia, and no cases of severe illness. There was a statistically significant difference in the composite of pneumonia and severe illness in KTR and HCW (27.6% vs. 4.8%; $p = .032$).

Finally, to determine the variables affecting anti-SARS-CoV-2 IgG levels, linear regression modeling was performed in selected subject groups.

3.3.1 | General factors influencing anti-SARS-CoV-2 IgG levels among all subjects with prior SARS-CoV-2 infection

In this model, the impact of general factors on anti-SARS-CoV-2 IgG levels was evaluated. Age, presence of clinical symptoms, moderate to severe symptoms, and KTR status were identified as significant factors in univariable analysis. Multivariable model next revealed the presence of clinical symptoms (Beta coefficient = 19.57, $p = .001$) and moderate to severe symptoms (Beta coefficient = 57.11, $p < .001$) to independently affect anti-SARS-CoV-2 IgG levels (Table 3).

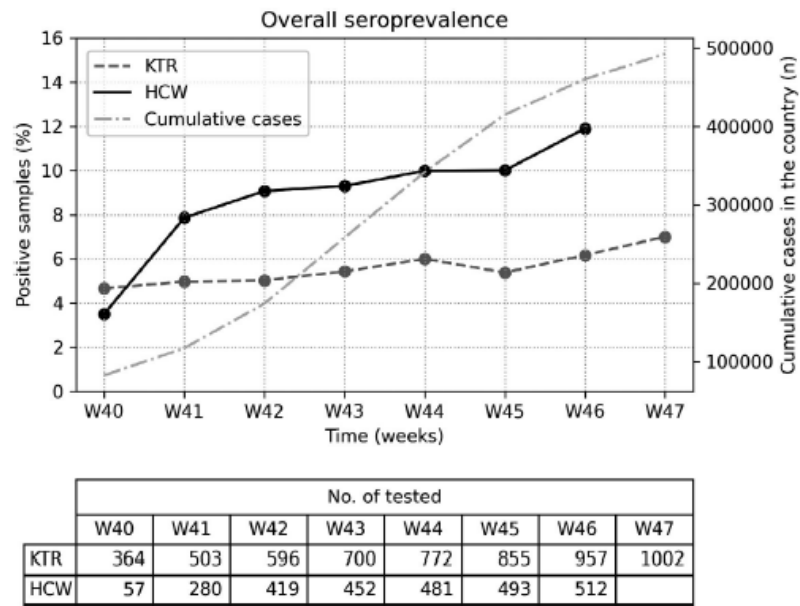


FIGURE 2 SARS-CoV-2 seroprevalence in kidney transplant recipients and health care workers at second peak of COVID-19 pandemic. Line graph shows percentage of seropositive kidney transplant recipients (KTR) and healthcare workers (HCW) on the Y axis over defined study period from week 40 to week 47 on the X axis. The secondary vertical axis shows cumulative cases with SARS-CoV-2 infection in the Czech Republic at that time, data were taken from Johns Hopkins Coronavirus Research Center website.²² For each week percentage of seropositive samples is calculated from cumulative sum of samples (the number of tested participants each week is the sum of that week and the previous weeks). Cumulative seroprevalence at week 40 was 6.8% in KTR and 11.9% in HCW. Enriched cohort of 35 symptomatic SARS-CoV-2 positive KTR is not included in the figure. Weeks 38 and 39 is not displayed, since only small proportion of KTR and healthcare workers were tested for anti-SARS-CoV-2 IgG in the initial phase of the study

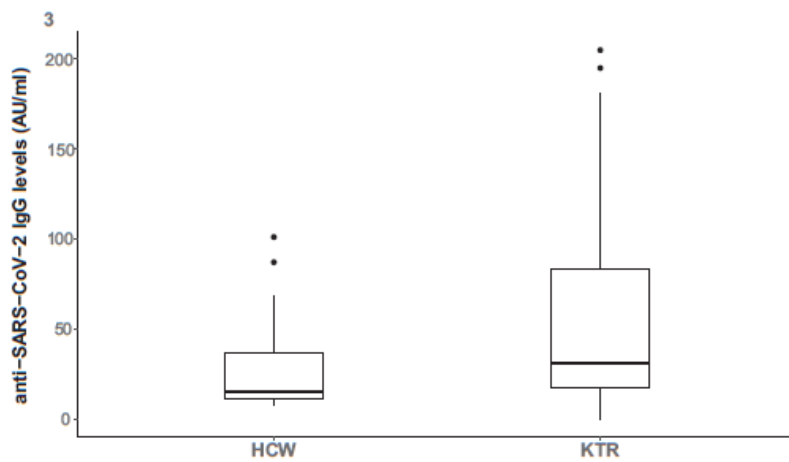


FIGURE 3 Anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels in healthcare workers (HCW) and kidney transplant recipients (KTR). Statistical difference assessed by the Mann-Whitney U test, $p < .001$

3.3.2 | Role of symptom severity and transplantation related variables in symptomatic KTR

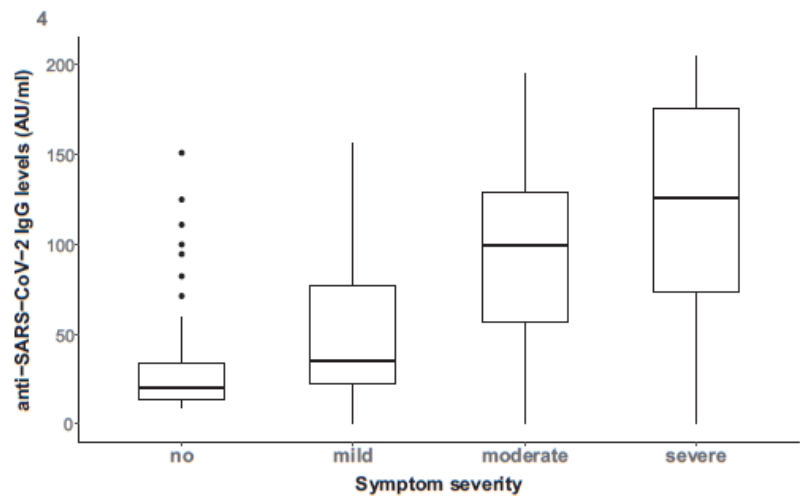
Next, the associations of clinical symptoms and transplantation related variables with anti-SARS-CoV-2 IgG levels among previously symptomatic KTR were analyzed. Results of all univariable regression results are shown in Table S1. The final multivariable model revealed that the presence of moderate to severe symptoms (Beta coefficient = 41.99,

$p = .011$) is the only independent factor associated with the levels of IgG antibodies in the population of symptomatic KTR (Table 4).

3.3.3 | Impact of immunosuppression withdrawal

There was a high rate of immunosuppression withdrawal among the symptomatic KTR - mycophenolate was withdrawn in 57.9%

FIGURE 4 Anti-SARS-CoV-2 IgG antibody levels in kidney transplant recipients stratified by symptom severity. Kidney transplant recipients were divided into groups by severity of symptoms to severe, moderate, mild, and no symptoms groups. Statistical difference assessed by Kruskal–Wallis test, $p < .001$ for overall model. Post-hoc test revealed significant differences between the following groups: no – mild symptoms, $p < .001$; no – moderate symptoms, $p < .001$; mild – moderate symptoms, $p = .023$; moderate – severe symptoms, $p = .017$



of cases with mild symptoms and in 81.8% of those with moderate symptoms, while all immunosuppressants were withdrawn in KTR with serious symptoms. Overall, mycophenolate or all immunosuppressants were withdrawn in 69% of the symptomatic KTR. In this multivariable model, symptom severity was substituted by immunosuppression withdrawal, which was revealed to be the only independent factor affecting anti-SARS-CoV-2 antibody levels (Beta coefficient = 44.17, $p = .003$; Table S2).

3.3.4 | Evaluation of time delay between symptom onset and antibody testing in all symptomatic subjects

Finally, a model including all symptomatic subjects (KTR and HCW) was made to assess whether the time from symptom onset to antibody testing plays a role in SARS-CoV-2 antibody levels in the subgroup of all symptomatic subjects. The time from symptom onset to antibody testing did not reach statistical significance (Table S3).

4 | DISCUSSION

Despite the large number of studies regarding COVID-19, the data on the immune response to SARS-CoV-2 infection in the kidney transplant population are still limited. The aim of our study was to analyze humoral immune response to SARS-CoV-2 in KTR and to compare it with an immunosuppression-naïve HCW control group. We used chemiluminescence immunoassay to test anti-SARS-CoV-2 IgG in a total of 1037 KTR and 512 HCW.

We found that humoral response to SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients is preserved and comparable to the immunocompetent cohort. Seroconversion was observed in all but four symptomatic KTR. That said, in our study, nearly all kidney transplant recipients with previous SARS-CoV-2 infection were able to mount SARS-CoV-2 antibodies. Columbia University study described that

among solid organ transplant recipients with confirmed SARS-CoV-2 infections, only 51% had detectable anti-nucleocapsid antibodies.¹⁰ This fact pointed towards different sensitivity of serologic assays.⁴ Another study evaluated the presence of anti-nucleocapsid antibodies and showed that only 10% of hemodialysis patients lacked the initial seroconversion;¹¹ however, in immunosuppressed patients, the level of seroconversion is anticipated to be lower while using the same method of antibody detection. Interestingly, current studies report impaired humoral response after SARS-CoV-2 mRNA vaccines in solid organ transplant patients.^{12,13} Although the explanation of this phenomenon is not yet clear, immune paresis promoted by the use of antimetabolite therapy has been suggested.¹⁴ In contrast, a higher antigen load during natural infection and frequent mycophenolate withdrawal in symptomatic patients may explain the observed well preserved immune response in KTR in our study.

SARS-CoV-2 antibody seroprevalence in kidney transplant recipients was 6.8% in our study. Prendecki et al described 10% seroprevalence in a similar patient population.⁴ Clearly, seroprevalence has been increasing during the pandemic and is likely to accelerate in the third wave along with the already vaccinated population. It is worth mentioning that the first wave of the pandemic in spring 2020 was marginal, and therefore, it is worth comparing the level of seroprevalence in similarly impacted populations regardless of the time period.

Healthcare workers represent a high-risk population for contracting SARS-CoV-2. In our study, we observed significantly higher seroprevalence amongst HCW than in KTR. Previous studies observed seroprevalence in HCW between 8.7%¹⁵ and 18%¹⁶ depending on the area hit by a pandemic wave.

In our study, we evaluated predisposing demographic, clinical or transplant-related factors to SARS-CoV-2 infection in kidney transplant recipients. Kidney transplant recipients who survived previous SARS-CoV-2 infection and mounted humoral immunity were younger than those who were not infected with SARS-CoV-2. The assumption is that elderly KTR were more cautious and practiced social distancing more strictly. Interestingly, kidney transplant

recipients treated with CNi were more prone to SARS-CoV-2 infection than those with a less intense CNi-free regimens.

Previous SARS-CoV-2 infection in survivors also had no impact on kidney graft function or proteinuria at the time of antibody screening. In our study, obese KTR were more likely to experience symptomatic course of SARS-CoV-2 infection, rather than asymptomatic one. It is widely known that obesity represents a risk factor for a more severe clinical course of SARS-CoV-2 infection.¹⁷

At last, we compared the antibody levels in KTR and HCW who survived the SARS-CoV-2 infection. Surprisingly, in KTR the anti-SARS-CoV-2 IgG levels were higher than in HCW. We assume that the higher levels of antibodies are associated with a more severe course of SARS-CoV-2 infection in KTR, which is supported by the results of our regression analysis.

Interestingly, kidney transplant recipients who experienced moderate to severe symptoms, mounted antibodies in significantly higher levels than those KTR with mild or asymptomatic disease course. This observation is in concordance with the results of other studies in non-transplant populations.^{18,19} In our study, the immunosuppression withdrawal occurred more commonly in patients with greater disease severity. Reduction of immunosuppression thus may play a role in antibody development.

We acknowledge the limitations of our study. First, we offered antibody testing to all participants regardless of symptoms or previous infection with SARS-CoV-2. We assume that some of the HCW with known PCR positivity could have been tested in order to find out their antibody status and that might have influenced higher overall seroprevalence in HCW. Second, since our antibody level screening discovered a significant number of seropositive asymptomatic KTR, we cannot determine the exact date of SARS-CoV-2 infection in these subjects, and thus, the time between infection and serologic testing could not be determined. The levels of antibodies have a known time-dependent dynamic in the general population²⁰ as well as in kidney transplant recipients.²¹ To at least partially address this issue, we included the time from symptom onset to serologic testing in our regression model of factors influencing the SARS-CoV-2 antibody levels and found no time-effect in the multivariable model. It is also important to note that some characteristics of the symptomatic cohort, such as BMI, can be underestimated because only patients who survived COVID-19 were evaluated.

In conclusion, kidney transplant recipients who survived SARS-CoV-2 infection mounted similar levels of anti-spike protein antibodies as their health care workers who experienced a less severe clinical course of the disease. Thus, humoral response to SARS-CoV-2 in this immunocompromised and comorbid population seems to be less impaired than previously expected.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Helena Marcinkova, Vera Jakesova, and Petr Smejkal from the Department of Hygiene for the help in collecting patients' data. The authors also thank Olga Kaucka and Marie Kolarova for their help with the collection of the biological material, Adela Sucha and Tomas Neskudla for their help with data collection

and technical support. Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic under grants NV19-06-00031 and its conceptual development of research organizations (Institute for Clinical and Experimental Medicine-IKEM, IN 00023001).

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Maria Magicova  <https://orcid.org/0000-0001-5556-9972>

Martina Fialova  <https://orcid.org/0000-0001-5595-3632>

Ivan Zahradka  <https://orcid.org/0000-0002-0043-7216>

Silvie Rajnochova-Bloudickova  <https://orcid.org/0000-0003-0270-571X>

David Hackajlo  <https://orcid.org/0000-0001-6889-0490>

Petr Raska  <https://orcid.org/0000-0001-7970-9298>

Ilija Striz  <https://orcid.org/0000-0001-9269-5652>

Ondrej Viklicky  <https://orcid.org/0000-0003-1049-2195>

REFERENCES

- Clift AK, Coupland CAC, Keogh RH, Hemingway H, Hippisley-Cox J. COVID-19 mortality risk in down syndrome: results from a cohort study of 8 million adults [published online ahead of print October 21, 2020]. *Ann Intern Med*. 2021;174(4):572-576.
- Phanish M, Ster IC, Ghazanfar A, et al. Systematic review and meta-analysis of COVID-19 and kidney transplant recipients, the South West London Kidney Transplant Network experience [published online ahead of print December 19, 2020]. *Kidney Int Rep*. 2021;6(3):574-585.
- Choi M, Bachmann F, Naik MG, et al. Low seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies during systematic antibody screening and serum responses in patients after COVID-19 in a German Transplant Center. *J Clin Med*. 2020;9(11):3401. Published October 23, 2020.
- Predecki M, Clarke C, Gleeson S, et al. Detection of SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(12):2753-2756.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [published correction appears in *Cell*. 2020;183(6):1735]. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6.
- Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois MA. Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. *Front Immunol*. 2020;11:610688. Published December 18, 2020.
- COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>. Accessed 25 Mar 2021.
- Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, et al. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2-neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *J Clin Microbiol*. 2020;58(9):e01224-e01320. Published August 24, 2020.
- National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison [published correction

- appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 Dec;20(12):e298. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(12):1390-1400.
10. Burack D, Pereira MR, Tsapepas DS, et al. Prevalence and predictors of SARS-CoV-2 antibodies among solid organ transplant recipients with confirmed infection [published online ahead of print February 16, 2021]. *Am J Transplant*. 2021;21(6):2254-2261.
 11. Sakhi H, Dahmane D, Attias P, et al. Kinetics of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in hemodialysis patients six months after infection [published online ahead of print February 26, 2021]. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(5):1033-1036.
 12. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients [published online ahead of print May 5, 2021]. *JAMA*. 2021;325(21):2204-2206.
 13. Marion O, Del Bello A, Abravanel F, et al. Safety and immunogenicity of anti-SARS-CoV-2 messenger RNA vaccines in recipients of solid organ transplants [published online ahead of print May 25, 2021]. *Ann Intern Med*. 2021. <https://doi.org/10.7326/M21-1341>.
 14. Aslam S, Danziger-Isakov L, Mehra MR. COVID-19 vaccination immune paresis in heart and lung transplantation [published online ahead of print May 13, 2021]. *J Heart Lung Transplant*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.04.018>.
 15. Galanis P, Vrakaki 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.
 16. Pallett SJC, Rayment M, Patel A, et al. Point-of-care serological assays for delayed SARS-CoV-2 case identification among health-care workers in the UK: a prospective multicentre cohort study [published correction appears in *Lancet Respir Med*. July 30, 2020]. *Lancet Respir Med*. 2020;8(9):885-894.
 17. Huang YI, Lu Y, Huang Y-M, et al. Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism*. 2020;113:154378.
 18. Ko JH, Joo EJ, Park SJ, et al. Neutralizing antibody production in asymptomatic and mild COVID-19 patients, in comparison with pneumonic COVID-19 patients. *J Clin Med*. 2020;9(7):2268. Published July 17, 2020.
 19. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(2):545-557.e9.
 20. Zhou W, Xu X, Chang Z, et al. The dynamic changes of serum IgM and IgG against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J Med Virol*. 2021;93(2):924-933.
 21. Chavarot N, Leruez-Ville M, Scemla A, et al. Decline and loss of anti-SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients in the 6 months following SARS-CoV-2 infection. *Kidney Int*. 2021;99(2):486-488.
 22. COVID-19 map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed May 18, 2021.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Magicova M, Fialova M, Zahradka I, et al. Humoral response to SARS-CoV-2 is well-preserved and symptom-dependent in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21:3926-3935. <https://doi.org/10.1111/ajt.16746>

6.2 Imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny na očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2

6.2.1 Úvod

Očkování je jedním ze základních nástrojů ochrany před infekcí a závažným průběhem onemocnění covid-19. U pacientů po transplantaci ledviny je ve srovnání s obecnou populací pozorována slabší imunitní odpověď na vakcíny proti SARS-CoV-2. Cílem studie bylo posoudit imunitní odpověď po očkování mRNA vakcínami u této imunosuprimované populace a definovat faktory, které ji ovlivňují.

6.2.2 Metodika

Do této prospektivní observační studie bylo zařazeno celkem 730 pacientů po transplantaci ledviny sledovaných v transplantačním centru IKEM, kteří byli očkováni 2 dávkami mRNA vakcíny (BNT162b2 nebo mRNA-1273) proti viru SARS-CoV-2. Naše analýza se zaměřovala na pacienty očkované na čekací listině, kteří následně podstoupili transplantaci ($n = 35$) a na pacienty očkované po transplantaci ($n = 695$). Do studie byli zahrnuti jak virus-naivní pacienti ($n = 661$), tak pacienti po prodělané SARS-CoV-2 infekci ($n = 69$) verifikované PCR testem na základě nazofaryngeálního výtěru. Pacienti s pozitivním PCR testem po 1. dávce vakcíny, pacienti s aktivní SARS-CoV-2 infekcí nebo po léčbě monoklonálními protilátkami proti SARS-CoV-2 do studie zařazeni nebyli.

U všech subjektů byla stanovena protilátková odpověď měřením IgG protilátek proti S1 a S2 podjednotkám virového spike proteinu využitím metody založené na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) s optimální cut-off hodnotou 9,5 AU/ml. Buněčná odpověď byla analyzována u 50 pacientů využitím testu založeného na stimulaci T-buněk specifickými virovými antigeny (IGRA) (viz 5. kapitola – analýza humorální a buněčné imunity).

6.2.3 Výsledky

Po očkování 2 dávkami mRNA vakcíny došlo k sérokonverzi u všech pacientů, kteří byli očkováni na čekací listině před transplantací. Naproti tomu v kohortě očkované až po transplantaci byla sérokonverze pozorována jen u 45,8 % pacientů, ale významně vyšší u subjektů s prokázanou dřívější SARS-CoV-2 infekcí oproti virus-naivním pacientům (97,1 % vs. 40,1 %, $p < 0,001$).

Virus-naivní pacienti očkovaní na čekací listině tvořili signifikantně vyšší hladiny protilátek než virus-naivní pacienti očkovaní po transplantaci, ale nižší než jedinci očkovaní po transplantaci s anamnézou covidu-19 (obr. 5).

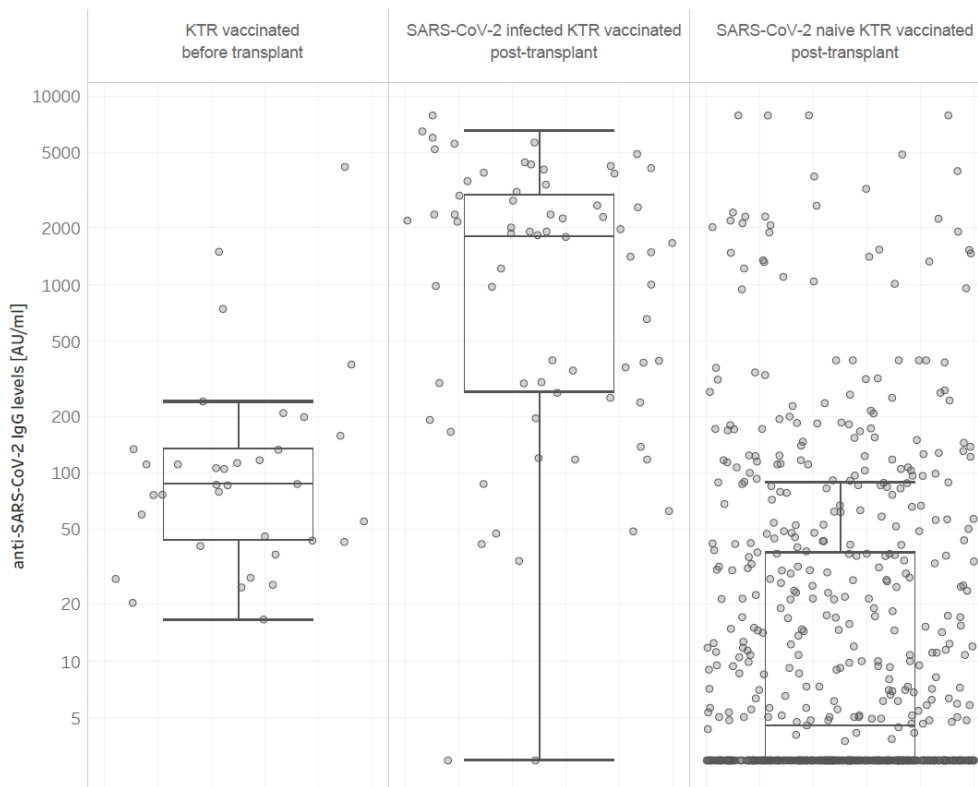
U pacientů očkovaných na čekací listině byl v době druhého sérologického testování (medián mezi prvním odběrem v den před provedením transplantace a druhým odběrem po transplantaci 20 dní, IQR 17–24 dní), při kterém již byli vystaveni imunosupresi, pozorován signifikantní pokles hladiny protilátek (1. měření: medián 136 AU/ml, IQR 92–177,5 AU/ml; 2. měření: medián 83,8 AU/ml, IQR 43,6–130 AU/ml, $p = 0,007$). Pokud jde o pacienty očkované po transplantaci, významný pokles hladiny protilátek mezi 1. měsícem a po 2. měsíci od ukončeného očkování byl pozorován ve skupině virus-naivních pacientů ($p = 0,035$), zatímco u pacientů s prodělanou nákazou nebyl pozorován signifikantní rozdíl (obr. 6).

Faktory asociované s lepší postvakcinační protilátkovou odpovědí byly v multivariabilní analýze mužské pohlaví (OR 1,97, 95% CI 1,33–2,93, $p = 0,001$), delší doba od transplantace (OR 1,007, 95% CI 1,004–1,01, $p < 0,001$), lepší funkce štěpu před očkováním (OR 1,034, 95% CI 1,023–1,044, $p < 0,001$) a dřívější infekce virem SARS-CoV-2 (OR 89,89, 95% CI 19,76–408,99, $p < 0,001$). S horší tvorbou protilátek po očkování byly naopak spojeny vyšší věk (OR 0,96, 95% CI 0,94–0,98, $p < 0,001$), mykofenolát mofetil v udržovací imunosupresi (OR 0,15, 95% CI 0,09–0,24, $p < 0,001$) a depleční léčba (antithymocytární globulin, rituximab) v posledním roce (OR 0,19, 95% CI 0,05–0,8, $p = 0,023$). V rámci dříve infikovaných jedinců měli vyšší hladiny protilátek po očkování pacienti s anamnézou středně závažného až závažného průběhu covidu-19 oproti jedincům s asymptomatickou infekcí ($p = 0,014$).

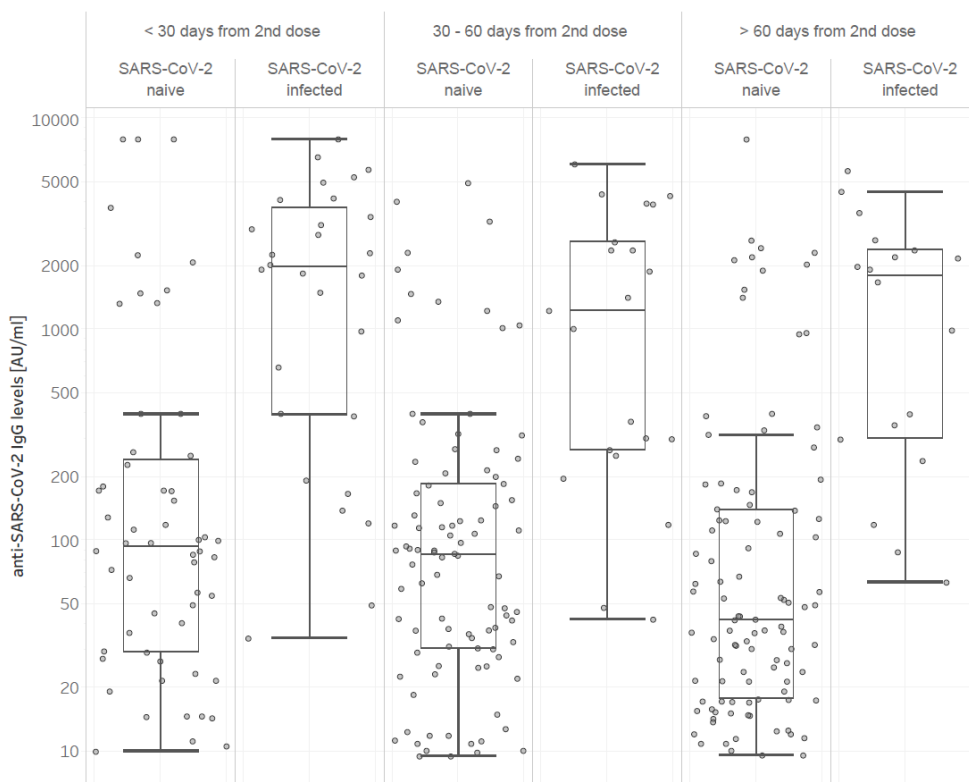
Z 50 testovaných jedinců byla buněčná odpověď, nehledě na dobu očkování a předchozí SARS-CoV-2 infekci, detekována v 26 % případů. T-buněčná odpověď na očkování po transplantaci byla signifikantně horší u virus-naivních pacientů ve srovnání s pacienty s anamnézou covidu-19 (9,4 % vs. 90 %, $p < 0,001$). Z osmi virus-naivních pacientů očkovaných na čekací listině před transplantací byla T-buněčná odpověď detekována pouze u jednoho. U deseti pacientů ze třinácti (76,9 %), u kterých byla detekována buněčná odpověď, došlo současně k sérokonverzi. V univariabilní analýze byla jediným signifikantním faktorem ovlivňujícím buněčnou odpověď prodělaná SARS-CoV-2 infekce (OR 87, 95% CI 8,02–943,36, $p < 0,001$).

U pacientů nebyl pozorován rozdíl v glomerulární filtraci před a po očkování (medián mezi měřeními 70 dní, IQR 52–91 dní; medián eGFR před očkováním 48 ml/min/1,73 m²,

IQR 34,8–61,8; medián eGFR po očkování 48 ml/min/1,73 m², IQR 33,6–61,8, $p = 0,685$). Tato analýza se týkala pouze pacientů očkových až po transplantaci.



Obr. 5 Hladiny anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek u (1) virus-naivních pacientů očkových před transplantací, (2) pacientů očkových po transplantaci s prokázanou dřívější infekcí virem SARS-CoV-2, (3) virus-naivních pacientů očkových po transplantaci. Signifikantní rozdíly byly pozorovány jak celkově napříč skupinami ($p < 0,001$), tak mezi jednotlivými skupinami (skupina 1 a 2, $p = 0,019$; skupina 1 a 3, $p < 0,001$; skupina 2 a 3, $p < 0,001$).



Obr. 6 Stabilita anti-SARS-CoV-2 IgG protilátek u pacientů očkových po transplantaci. Signifikantně nižší hladiny protilátek byly pozorovány u virus-naivních pacientů v období do 30 dnů a nad 60 dnů od vakcinace ($p = 0,035$).

6.2.4 Diskuse

Hlavním cílem této studie bylo stanovení humorální imunitní odpovědi indukované dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny. Dalšími cíli byla analýza faktorů determinujících postvakcinační protilátkovou imunitní odpověď, analýza postvakcinační buněčné odpovědi a stanovení funkce štetu po očkování. Z předchozích studií víme, že imunitní odpověď po vakcinaci proti SARS-CoV-2 je u pacientů po transplantaci ledviny slabší než u imunokompetentních jedinců (Grupper A. et al., 2021). Naše studie na mnohem větší kohortě pacientů po transplantaci potvrdila horší imunogenicitu vakcín v této populaci.

Ve skupině pacientů očkových po transplantaci byla sérokonverze detekována u necelé poloviny testovaných. To je v kontrastu se 100% sérokonverzí u pacientů očkových na čekací listině před transplantací. Tento výsledek poukazuje na negativní vliv imunosupresivní léčby na tvorbu postvakcinačních protilátek, jelikož ani jeden z pacientů očkových na čekací listině neužíval v době vakcinace imunosupresiva. Podobně Danthu

et al. prokázal robustnější imunitní odpověď u hemodialyzovaných pacientů oproti pacientům po transplantaci ledviny. Po dvou dávkách mRNA vakcíny detekoval anti-spike IgG protilátky u 81 % dialyzovaných a jenom u 4,1 % transplantovaných pacientů (Danthu C. et al., 2021). Tato data však nelze zcela srovnávat s našimi, jelikož sérologické testování pacientů očkovaných na čekací listině v naší studii probíhalo až po transplantaci, i když relativně časně, kdy se ještě nemusel významně uplatnit vliv imunosuprese. Na druhou stranu jsme v této skupině pacientů již během krátkého období pozorovali významný pokles hladiny protilátek.

Hybridní imunita vzniká kombinací přirozené imunizace po infekci a postvakcinační imunity. Většina studií do té doby pacienty s anamnézou covidu-19 z analýz vyřazovala (Grupper A. et al., 2021). Abychom mohli posoudit možný vliv předchozí infekce virem SARS-CoV-2 na imunitní odpověď po očkování, zařadili jsme do studie i dříve infikované pacienty. Všechny tyto případy byly ověřeny prostřednictvím Národního zdravotního registru – Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS), kde byly povinně hlášeny pozitivní PCR testy. Míra sérokonverze pacientů s hybridní imunitou očkovaných po transplantaci byla signifikantně vyšší (97,1 %) oproti virus-naivním pacientům (40,1 %) a dříve infikovaní pacienti hlavně dosahovali daleko vyšších hladin protilátek. Podobnou míru sérokonverze (37,5 %) po 2 dávkách mRNA vakcíny využitím identické metody (CLIA) pozoroval u pacientů bez předchozí nákazy Grupper (Grupper A. et al., 2021). Významný vliv dřívější infekce na tvorbu protilátek po očkování proti SARS-CoV-2 byl prokázán nejen v obecné (Manisty C. et al., 2021), ale také v transplantované populaci (Boyarsky B. J. et al., 2021).

Dalším cílem studie byla analýza faktorů ovlivňujících imunitní odpověď po vakcinaci. Hlavními faktory asociovanými s porušenou tvorbou postvakcinačních protilátek byly vyšší věk, mykofenolát mofetil v udržovací imunosupresivní terapii a podání depleční léčby v posledním roce. V Cucchiariho studii byl diabetes dalším z faktorů negativně ovlivňujících imunitní odpověď na očkování (Cucchiari D. et al., 2021). V naší studii diabetes neměl vliv na postvakcinační sérokonverzi. Asociace vyššího věku s porušenou imunitní odpovědí po očkování proti covidu-19 v transplantované populaci byla prokázána v několika studiích (Grupper A. et al., 2021, Boyarsky B. J. et al., 2021, Rozen-Zvi B. et al., 2021). Jedním z vysvětlení by mohly být fyziologické změny imunitního systému, ke kterým dochází v souvislosti se stárnutím (imunosenescence).

Negativní vliv mykofenolát mofetilu byl popsán již v souvislosti s očkováním proti chřipce (Baluch A. et al., 2013). V rámci očkování proti SARS-CoV-2 byly v jiných studiích

kromě mykofenolát mofetilu identifikovány jako negativní faktory postvakcinační odpovědi také kalcineurinové inhibitory (Rozen-Zvi B. et al., 2021) a ve shodě s našimi výsledky i léčba antithymocytárním globulinem v posledním roce (Cucchiari D. et al., 2021). To je důvodem pozitivního vlivu delší doby od transplantace, a tedy i od indukční léčby, na tvorbu protilátek po očkování. Zajímavým zjištěním bylo to, že ani u jednoho pacienta na léčbě blokátorem kostimulace belataceptem v naší analýze nedošlo po očkování k sérokonverzi, a to ani u dříve infikovaných jedinců. Podobné výsledky ohledně belataceptu byly pozorovány v menší francouzské studii (Bertrand D. et al., 2021).

Stabilní hladiny protilátek po dobu minimálně 2 měsíců byly pozorovány pouze u pacientů s hybridní imunitou očkových po transplantaci. Delší sledování pacientů by bylo jistě přínosné k určení dlouhodobé kinetiky protilátek.

Buněčnou odpověď po očkování jsme analyzovali pouze u malé subkohorty pacientů. Celkově jsme detekovali SARS-CoV-2 specifické T-lymfocyty u necelé třetiny pacientů. V jiných studiích byla po 2 dávkách mRNA vakcíny detekována buněčná odpověď u 22 % až 57,8 % pacientů po transplantaci ledviny (Arias-Cabrales C. et al., 2023, Bertrand D. et al., 2021). Pro srovnání, v populaci dialyzovaných pacientů to bylo 100 % (Bertrand D. et al., 2021). Podobně jako v případě humorální postvakcinační odpovědi, jsme u pacientů s anamnézou covidu-19 pozorovali robustnější T-buněčnou odpověď než u virus-naivních pacientů. Jediným faktorem významně ovlivňujícím vývoj SARS-CoV-2 specifických T-lymfocytů v univariabilní analýze byla předchozí SARS-CoV-2 infekce. Multivariabilní analýza nemohla být provedena vzhledem k malému počtu pacientů.

Jednou z limitací studie je možnost klasifikace některých pacientů jako virus-naivních. Z tohoto důvodu jsme všechny studované subjekty ověřili v ÚZIS s povinně hlášenými případy infekce. Avšak sérologické testování aplikované v jiných studiích může také minout pacienty s anamnézou covidu-19, kteří nevytvořili protilátky, případně jen v malém množství. Další limitací je malá skupina pacientů, u kterých jsme analyzovali buněčnou odpověď, jež je významným prvkem imunologické paměti. Ačkoliv jsme ve studii nehodnotili neutralizační aktivitu protilátek, a tudíž není jasné, do jaké míry jsou námi detekované protilátky protektivní, víme, že titr anti-S1 specifických IgG protilátek vykazuje silnou korelaci s neutralizační aktivitou proti VOCs, i když pro neutralizaci posledně dominující varianty *Omicron* jsou potřebné vyšší hladiny anti-S1 protilátek (Kho M. et al., 2023). Na druhou stranu šlo o rozsáhlou prospektivní studii s velkým souborem pacientů, a pokud víme, jako první jsme do analýzy zahrnuli pacienty po transplantaci ledviny, kteří byli očkováni ještě na čekací listině.

Ačkoliv na základě hladin postvakcinačních SARS-CoV-2 specifických protilátek a T-lymfocytů nelze vyvodit účinnost vakcín, může sérologické testování po očkování poskytovat hrubý odhad míry protekce před infekcí SARS-CoV-2. Bylo totiž prokázáno, že postvakcinační neutralizační protilátky a S2-specifická IFN- γ buněčná odpověď významně snižují riziko průlomové infekce SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny (Kemlin D. et al., 2023). Na druhou stranu sérologické testování v současnosti není doporučováno ke stanovení imunity proti SARS-CoV-2 a rozhodování o nutnosti vakcinace u neočkovaných osob (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, National Institutes of Health, 2024). Nicméně určitý přínos mít může, jelikož se ukázalo, že znalost sérostatusu po očkování vedla u non-responderů k vyšší adhezenci k preventivním opatřením a také k nižšímu výskytu infekcí (Frölke S. C. et al., 2023).

Závěr

K nejrobustnější imunitní odpovědi na mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 v populaci pacientů po transplantaci ledviny dochází u jedinců s dříve prodělanou nákazou a u pacientů očkovaných ještě na čekací listině. Hlavní faktory negativně ovlivňující postvakcinační humorální odpověď jsou vyšší věk a imunosuprese, zejména mykofenolát mofetil a depleční léčba v posledním roce před očkováním.

Článek byl publikován v časopise Transplantation.

Determinants of Immune Response to Anti-SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study. *Transplantation*. 2022 Apr 1;106(4):842-852.

Kompletní článek je přiložen v anglickém jazyce.



Determinants of Immune Response to Anti-SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study

Maria Magicova, MD,¹ Ivan Zahradka, MD,¹ Martina Fialova, MSc,² Tomas Neskudla, MD,³ Jiri Gurka, MD,³ Istvan Modos, PhD,³ Michal Hojny, MSc,⁴ Petr Raska, MSc,³ Petr Smejkal, MD,⁵ Ilja Striz, MD, PhD,² and Ondrej Viklicky, MD, PhD^{1,6}

Background. Immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccination has been recently shown to be impaired in kidney transplant recipients (KTRs), but the underlying factors affecting vaccine effectiveness need to be further elucidated. **Methods.** In this prospective cohort study, antibodies against S1 and S2 subunits of SARS-CoV-2 were evaluated using an immunochemiluminescent assay (cutoff 9.5 AU/mL, sensitivity 91.2%, and specificity 90.2%) in 736 KTRs, who were previously either naive or infected with SARS-CoV-2 and vaccinated before or after transplantation. Cellular response was analyzed in a subset of patients using an interferon gamma release assay (cutoff 0.15 IU/mL, sensitivity 92%, and specificity 100%). **Results.** Seroconversion was significantly more impaired in SARS-CoV-2-naïve KTRs than in those previously infected (40.1% versus 97.1%; $P < 0.001$). Mycophenolate use (odds ratio, 0.15; 95% confidence interval, 0.09-0.24; $P < 0.001$) and depleting therapy in the past year (odds ratio, 0.19; 95% confidence interval, 0.05-0.8; $P = 0.023$) were found to be among independent factors associated with impaired humoral response. Similarly, the interferon gamma release assay tested in 50 KTRs (cutoff 0.15 IU/mL, sensitivity 92%, specificity 100%) showed that specific T-cell responses against spike protein epitopes are impaired in SARS-CoV-2-naïve KTRs, as compared to previously infected KTRs (9.4% versus 90%, $P < 0.001$). All 35 KTRs vaccinated on the waiting list before transplantation exhibited sustained seroconversion persisting after transplantation. **Conclusions.** Survivors of coronavirus disease 2019 and those vaccinated while on the waiting list exhibited a marked immune response to mRNA vaccines, contrary to poor response in naive KTRs vaccinated after transplantation (NCT04832841).

(*Transplantation* 2022;106: 842–852).

INTRODUCTION

Kidney transplant recipients (KTRs) represent one of the most vulnerable populations to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, as

coronavirus disease 2019 (COVID-19) is associated with a several-fold higher case fatality rate compared with the general population.¹ Therefore, an effective vaccination strategy similar to those already implemented in the general

Received 30 September 2021. Revision received 8 November 2021.

Accepted 23 November 2021.

¹ Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

² Department of Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

³ Information Technology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁴ Institutional Pharmacy, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁵ Division of Hygiene and Epidemiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁶ Transplantation Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

M.M. and I.Z. contributed equally to this work.

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (grants NV19-06-00031 and NU21-06-00021) and its conceptual development of research organizations (Institute for Clinical and Experimental Medicine-IKEM, IN 00023001).

The authors declare no conflicts of interest.

All authors were responsible for the conceptualization of the study, participated in the acquisition of resources, and contributed to the review and editing of the final article. M.M., I.Z., T.N., J.G., I.M., and P.R. took part in data curation. M.M., I.Z., and I.M. were responsible for formal analysis and validated the results. O.V., M.H., P.S., and I.S. were responsible for funding acquisition. M.M., I.Z., and M.F. conducted the investigation. M.M., I.Z., M.F., I.M., I.S., and O.V. were responsible for the methodology. O.V. and I.S. were responsible for project administration and supervision. T.N., J.G., I.M., and P.R. were responsible for the software support. I.Z. and T.N. had taken part in the visualization. M.M., I.Z., and O.V. wrote the original draft. M.M. and I.Z. contributed equally to this work.

This study is registered under the identifier NCT04832841 on ClinicalTrials.gov.

Supplemental Visual Abstract; <http://links.lww.com/TP/C340>.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Correspondence: Ondrej Viklicky, MD, PhD, Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic. (ondrej.viklicky@ikem.cz).

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/1064-842

DOI: 10.1097/TP.0000000000004044

population^{2,3} would seem to be a critical tool necessary for the improvement of COVID-19 outcomes in KTRs.

However, despite the high clinical efficacy of mRNA vaccines^{4,5} and sufficient humoral response in the general population,⁶ impaired vaccine response has been reported in immunocompromised individuals, such as KTRs.^{7,8} Recent study of 308 KTRs found only a 36.4% seroconversion rate after administration of 2 doses of BNT162b2 mRNA vaccine,⁹ whereas another indicated anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin G (IgG) reactivity in just 8.33% KTRs, and none of the subjects developed neutralizing antibodies.⁷ Even more interestingly, humoral response in KTRs seems to be more impaired after vaccination than after a natural infection, as the majority of KTRs develop significant levels of antispikes antibodies after a natural infection,¹⁰ as we have previously reported. Therefore, a significant proportion of KTRs still possibly remain at an increased risk of contracting SARS-CoV-2 despite being vaccinated, which resembles previous experiences with other vaccinations in the transplant population.

It is therefore important to better understand the causes of poor immune response to mRNA vaccines in KTRs and, vice versa, to define patient cohorts in which vaccination is more effective. Patients on dialysis developed significantly higher anti-SARS-CoV-2 antibody levels than KTRs,¹¹ which indicates that immunosuppression is likely a critical factor limiting mRNA vaccine efficacy. Higher calcineurin inhibitor levels, higher doses of mycophenolate,⁹ and antithymocyte globulin administered during the last year before vaccination¹² have recently been proposed as possible causes of poor immune response. Additionally, whether previous SARS-CoV-2 infection enhances antibody production after vaccination in KTRs is not known because individuals previously infected with the virus were generally not included in the studies.^{7,13} However, enhanced humoral response after SARS-CoV-2 infection was observed in fully vaccinated general population¹⁴ and lung transplant recipients.¹⁵

To better define the variables affecting the immune response to mRNA vaccines in KTRs, we conducted a large single-center prospective cohort study of 736 KTRs, who had been fully vaccinated with either BNT162b2 or mRNA-1273 vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A total of 753 KTRs were enrolled in this prospective single-center observational cohort study registered as NCT04832841 between March 18, 2021, and June 3, 2021. All KTRs followed at our center, and all patients on the waiting list for a kidney transplant registered at our center who signed up for vaccination with mRNA vaccines (Pfizer/BioNTech BNT162b2 or Moderna mRNA-1273) were eligible to participate in the study. All patients were adults, and the vaccination was performed either while the patients were on the waiting list or after kidney transplantation. Serum samples were collected at least 14 d after the administration of the second vaccine dose. In KTRs vaccinated while on the waiting list, serum samples were collected at least 14 d after the transplant. The study cohort consisted of KTRs previously infected with SARS-CoV-2

and virus-naïve subjects. Previous SARS-CoV-2 infection was defined by a positive polymerase chain reaction (PCR) test performed at any time before the first vaccine dose. To eliminate reporting bias, all previous SARS-CoV-2 infection records were verified in the official government central registry (<https://www.uzis.cz/index-en.php>), where all positive test results are mandatorily reported from laboratories throughout the country. The exclusion criteria were (1) positive PCR test for SARS-CoV-2 after the first vaccine dose, (2) active SARS-CoV-2 infection at the time of enrollment, and (3) previous treatment with anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies.

Study Population

Of the 753 KTRs, 17 were excluded because of a positive PCR test for SARS-CoV-2 after the first vaccine dose (Figure 1). Therefore, 736 KTRs were eligible to participate in the study, and they were further divided into predefined subgroups according to vaccination timing (before or after transplant) and previous SARS-CoV-2 infection.

A total of 41 KTRs were vaccinated while being wait-listed for kidney transplantation. Of these patients, 35 (85.4%) had no history of SARS-CoV-2 infection, and 6 KTRs (14.6%) had tested positive for SARS-CoV-2 in the past and were therefore not further analyzed. Out of 35 KTRs vaccinated while on the waiting list, 22 were hemodialysis patients with a median dialysis time of 21 mo (interquartile range [IQR], 11.8–41.7), 7 were peritoneal dialysis patients with a median dialysis time of 20.4 mo (IQR, 4.8–21.6), and 6 patients underwent preemptive transplantation. None of the KTRs vaccinated while on the waiting list were on maintenance immunosuppression at the time of vaccination.

Overall, 695 KTRs were vaccinated after transplantation. This cohort comprised previously infected KTRs ($n=69$; 9.9%) and virus-naïve KTRs ($n=626$; 90.1%). The median time between confirmed SARS-CoV-2 infection and first vaccine dose was 94 d (IQR, 68–125 d).

Written informed consent and consent to personal data processing were obtained from all participants before their enrollment. The ethical board approved this study under No. G-21-07.

Outcome Measures

The primary objective of the study was to assess the humoral response to mRNA vaccines in predefined groups of KTRs. The secondary objectives were to (1) define factors influencing the development of anti-SARS-CoV-2 IgG, (2) evaluate kidney graft function following vaccination, and (3) analyze cellular response to mRNA vaccines in a subset of KTRs.

Anti-SARS-CoV-2 Antibody Detection

All participants were tested for anti-SARS-CoV-2 IgG after the second vaccine dose. Anti-SARS-CoV-2-IgG against the spike protein were analyzed using the LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG chemiluminescence immunoassay (DiaSorin S.p.A., Italy). According to previously published methodological procedures concerning the measurement methods,^{16,17} the method was validated using stored frozen samples obtained from subjects before the SARS-CoV-2 pandemic ($n=41$) and from patients with

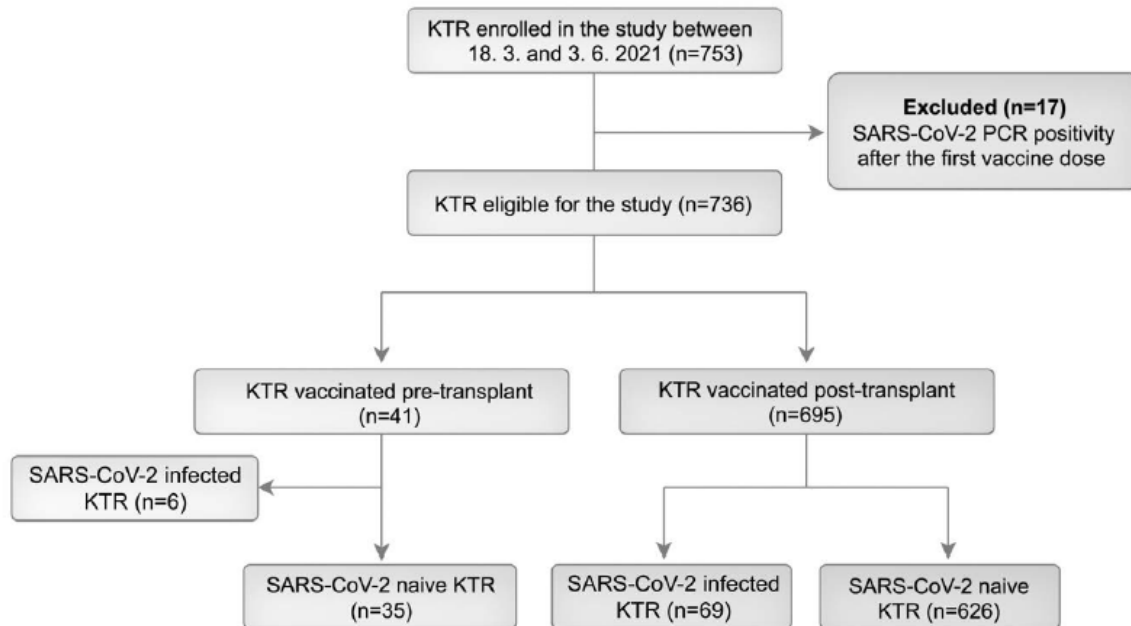


FIGURE 1. Study flowchart. A total of 753 KTRs were enrolled in the study between March 18, and June 3, 2021. Seventeen KTRs with SARS-CoV-2 infection verified by PCR test between the first vaccine dose and antibody testing were excluded from the study. Overall, 736 KTRs were eligible for this study. Participants were further divided according to predefined categories. Of the 41 KTRs vaccinated while on the waiting list, only 6 KTRs had a history of SARS-CoV-2 infection and were not used in the analysis. The other 35 virus-naive KTRs were analyzed for humoral immunity, with 8 of them also tested for cellular immunity. Of the 695 KTRs vaccinated posttransplant, 69 KTRs were previously infected with SARS-CoV-2, whereas 626 had no history of infection. KTR, kidney transplant recipient; PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

SARS-CoV-2 infection verified by real-time PCR ($n=34$). The cutoff 9.5 arbitrary units (AU/mL) was considered as a positive result with a 91.2% sensitivity (95% confidence interval [CI], 76.3-98.1) and 90.2% specificity (95% CI, 76.9-97.3) determined using MedCalc Statistical Software version 19.1.

Detection of a Specific Cellular Immune Response to SARS-CoV-2

A total of 50 KTRs were analyzed for cellular immune response; 8 received vaccines while on the waiting list, 32 vaccinated posttransplant were SARS-CoV-2 naive, and 10 were previously SARS-CoV-2 infected (Figure 1). Study subjects were tested for the specific cellular immune response to SARS-CoV-2 using an interferon gamma (IFN- γ) release assay. The principle of this assay is based on the measurement of IFN- γ released by antigen-specific T cells after overnight stimulation with specific SARS-CoV-2 peptides. The IFN- γ release assay test was performed in 2 steps. First, 500 μ L of whole blood (Lithium Heparin collection tube, Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Austria) was pipetted into tree tubes containing Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin, and 1% streptomycin (Sigma-Aldrich). We used 1 tube containing phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich) at a concentration of 2.5 ng/mL as a positive control and 1 negative control tube without any stimulants. A pool of peptides containing spike protein epitopes, nucleoprotein, membrane protein open reading frame 3a, and open reading frame 7a (0.8 μ g/mL) was used for the

specific stimulation (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden). The samples were then incubated at 37 °C for 24 h. In the second step, the plasma levels of IFN- γ (IU/mL) were measured using LIAISON QuantiFERON-TB Gold Plus (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy).

The method was validated using 69 whole blood samples obtained from healthy volunteers. Fifty samples were collected from subjects with a previous SARS-CoV-2 infection or who had been vaccinated with 2 doses of BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), and 19 samples were collected from subjects without a history of SARS-CoV-2 infection. The optimized cutoff (0.15 IU/mL) with 92% sensitivity (95% CI, 80.8-97.8) and 100% specificity (95% CI, 82.4-100) was determined using MedCalc Statistical Software version 19.1.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY) and R-studio version 1.2.5019 (Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA). Normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Because the majority of the data did not fit the normal distribution, only nonparametric statistical methods were used. Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests were used to compare continuous variables. Pearson chi-square test or Fischer exact test was used to compare categorical variables. Descriptive statistics are reported as medians and IQRs for continuous variables and numbers and percentages for categorical variables. Logistic regression was used to identify the predictors of antibody detection and cellular immunity. Univariable regression was calculated, and variables with

$P < 0.25$ from univariable analysis or with clear biological importance were entered into the multivariable regression model. Because tacrolimus-based immunosuppression is the standard of care, a categorical variable incorporating other regimens was constructed and tacrolimus-based immunosuppression was used as an indicator/reference variable in the regression analysis. Results are reported as odds ratios (ORs) with 95% CIs. All tests were performed at the 5% level of significance.

RESULTS

Humoral Response in KTRs Following SARS-CoV-2 mRNA Vaccination

The primary objective of this study was to assess the humoral immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in previously prespecified groups: (1) SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated after transplantation, (2) SARS-CoV-2 previously infected KTRs vaccinated after transplantation, and (3) SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated on the waiting list. The basic characteristics of the study groups are presented in Tables 1 and 2. Prime-boost vaccination was performed with a median 21-d interval between the 2 doses of BNT162b2 vaccines, and with a median of 28 d in case of mRNA-1273 vaccines. The median time from the second dose to antibody testing was 48 d, (IQR, 30–69).

Seroconversion (defined as a detectable level of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies of at least 9.5 AU/mL) was observed in 318 (45.8%) KTRs vaccinated with 2 doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine after transplantation, as opposed to a 100% seroconversion rate observed among KTRs vaccinated while on the waiting list ahead of transplantation.

When the predefined groups of SARS-CoV-2-naïve and previously infected KTRs vaccinated after transplantation were added together, the anti-SARS-CoV-2 IgG levels were significantly lower in those KTRs vaccinated after transplantation, as opposed to KTRs vaccinated while on the waiting list (median, 6 AU/mL; IQR, 0–86.7 versus median, 87.4 AU/mL; IQR, 43.4–135 AU/mL; $P < 0.001$). When analyzing only KTRs vaccinated after transplantation ($n = 318$), in whom seroconversion was observed, the anti-SARS-CoV-2 IgG levels were similar to KTRs vaccinated while on the waiting list (median, 98.8 AU/mL; IQR, 31.6–400 versus median 87.4 AU/mL; IQR, 43.4–135; $P = 0.551$).

Sixty-seven out of 69 (97.1%) KTRs vaccinated after transplantation who were previously infected with SARS-CoV-2 reached seroconversion. This is a significantly higher seroconversion rate than in virus-naïve KTRs, where seroconversion was observed in 251 out of 626 KTRs (40.1%; $P < 0.001$). Furthermore, anti-SARS-CoV-2 IgG levels were significantly higher in previously SARS-CoV-2-infected KTRs vaccinated after transplantation than in those who were naïve (median 1810 AU/mL; IQR, 261–3070 versus median 4.6 AU/mL; IQR, 0–37.6; $P < 0.001$).

SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated after transplantation had lower anti-SARS-CoV-2 antibody levels than SARS-CoV-2-naïve patients vaccinated while on the waiting list. KTRs who were infected with SARS-CoV-2 before vaccination had higher levels of antibodies than those who were SARS-CoV-2 naïve, regardless of whether they were vaccinated before or after transplantation. Statistically significant differences were observed among the 3 groups (Figure 2).

TABLE 1.

Characteristics of SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated pretransplant and KTRs vaccinated posttransplant (both SARS-CoV-2-naïve and previously SARS-CoV-2-infected)

	Pretransplant vaccinated KTR (SARS-CoV-2 naïve) (n = 35)	Posttransplant vaccinated KTR (n = 695)	<i>P</i> ^a
Age (y), median (IQR)	55.8 (47.5–66.5)	64.4 (55–70.7)	<0.001
Sex (male), no. (%)	30 (85.7%)	443 (63.7%)	0.008
Previous infection with SARS-CoV-2, no. (%)	0 (0%)	69 (9.9%)	0.295
BMI, median (IQR)	26.4 (23.1–28.2)	28 (24.9–31.3)	0.003
Diabetes, no. (%)	7 (20%)	203 (29.2%)	0.24
mRNA vaccine type (BNT162b2), no. (%) ^b	35 (100%)	663 (95.4%)	0.394
Tacrolimus-based IS, no. (%)	33 (94.3%)	559 (80.4%)	0.041
Cyclosporine-based IS, no. (%)	0 (0%)	72 (10.4%)	0.04
CNI-free IS, no. (%)	2 (5.7%)	64 (9.2%)	0.486
MMF/MPA, no. (%)	33 (94.3%)	537 (77.3%)	0.018
mTORi, no. (%)	2 (5.7%)	49 (7.1%)	1
Costimulatory blocker, ^c no. (%)	1 (2.9%)	10 (1.4%)	0.42
Depleting induction, ^d no. (%)	5 (14.3%)	296 (42.6%)	0.001
Antirejection therapy, no. (%)	4 (11.4%)	223 (32.1%)	0.01
Time from transplant (mo), median (IQR)	0.63 (0.53–0.93)	71.1 (24.1–142.5)	<0.001
Time from second vaccine dose to antibody testing (d), median (IQR)	71 (46–84)	47 (29–67)	<0.001

^a*P* values for group comparison based on the Mann-Whitney U test for continuous variables and Pearson chi-square test or Fischer exact test for categorical variables; $P < 0.05$ for significance.

^bThe rest of KTRs were vaccinated with mRNA-1273.

^cBelatacept and iscalimab.

^dAntithymocyte globulin and rituximab.

BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; IQR, interquartile range; IS, immunosuppression; KTR, kidney transplant recipient; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

TABLE 2. Characteristics of KTRs with and without previous infection with SARS-CoV-2 vaccinated posttransplant

	SARS-CoV-2 infected (n=69)	SARS-CoV-2 naive (n=626)	P ^a
Age (y), median (IQR)	57.1 (49–68.7)	65 (56.1–70.8)	<0.001
Sex (male), no. (%)	45 (65.2%)	398 (63.6%)	0.788
eGFR (mL/min/1.73 m ²), median (IQR)	54.6 (38.7–68.4)	47.4 (34.8–61.2)	0.082
BMI, median (IQR)	27.5 (24.2–30.9)	28 (24.9–31.3)	0.445
Diabetes, no. (%)	16 (23.2%)	187 (29.9%)	0.247
mRNA vaccine type (BNT162b2), no. (%) ^b	55 (79.7%)	605 (96.6%)	<0.001
Tacrolimus-based IS, no. (%)	56 (81.2%)	503 (80.4%)	0.872
Cyclosporine-based IS, no. (%)	8 (11.6%)	64 (10.2%)	0.723
CNI-free IS, no. (%)	5 (7.2%)	59 (9.4%)	0.553
MMF/MPA, no. (%)	55 (79.7%)	482 (77%)	0.61
mTORi, no. (%)	3 (4.3%)	46 (7.3%)	0.355
Costimulatory blocker, ^c no. (%)	1 (1.4%)	9 (1.4%)	0.994
Depleting induction, ^d no. (%)	34 (49.3%)	262 (41.9%)	0.237
Antirejection therapy, no. (%)	21 (30.4%)	202 (32.3%)	0.757
Time from transplant (mo), median (IQR)	60.2 (23.9–127.4)	72.8 (25.1–143.2)	0.562
Time from second vaccine dose to antibody testing (d), median (IQR)	39 (21.5–63)	48 (30–69)	0.004

^aP values for group comparison based on the Mann-Whitney U test for continuous variables, and Pearson chi-square test or Fisher exact test for categorical variables, $P < 0.05$ for significance.

^bThe rest of KTRs were vaccinated with mRNA-1273.

^cBelatacept and iccalimab.

^dAntithymocyte globulin and rituximab.

BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IQR, interquartile range; IS, immunosuppression; KTR, kidney transplant recipient; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

Determinants of Anti-SARS-CoV-2 IgG Production After the Second Vaccine Dose

Next, factors affecting anti-SARS-CoV-2 IgG production were assessed. This analysis was performed in KTRs vaccinated after transplantation. KTRs were divided into 2 groups based on whether seroconversion was reached after the second vaccine dose (responders) or not (nonresponders). The characteristics of the responders and nonresponders are shown in Table 3. In summary, responders were younger, had higher estimated glomerular filtration rate (eGFR), longer time interval between transplantation and vaccination, had a higher proportion of males, a higher proportion of previous SARS-CoV-2 infections, were more likely to receive mRNA-1273 vaccine, had a higher proportion of cyclosporine and mTOR inhibitor-based therapy, lower use of mycophenolate, and received depleting therapy within the past year less often.

Univariable and multivariable logistic regression analyses were further performed, where seroconversion was used as the dependent variable (Table 4; Table S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C339>). Factors independently associated with higher rates of seroconversion in the multivariable model were previous SARS-CoV-2 infection (OR, 89.89; $P < 0.001$), male sex (OR, 1.97; $P < 0.001$), longer time from transplant (OR, 1.01; $P < 0.001$), and better graft function before vaccination (OR, 1.03; $P < 0.001$). Older age (OR, 0.96; $P < 0.001$), mycophenolate mofetil (OR, 0.15; $P < 0.001$), and depletion therapy within the past year (OR, 0.19; $P = 0.023$) were independently associated with lower seroconversion rates after vaccination.

Renal Graft Function After Vaccination

eGFR (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) was evaluated in the KTRs before and after vaccination. This analysis was performed only in the

cohort of KTRs vaccinated after transplantation. There was no significant difference in eGFRs between the 2 measurements performed at median of 70 d (IQR, 52–91 d; prevaccination eGFR median 48 mL/min/1.73 m²; IQR, 34.8–61.8 versus postvaccination eGFR median 48 mL/min/1.73 m²; IQR, 33.6–61.8; $P = 0.685$).

Cellular Immune Response in KTRs

Cellular response to the mRNA vaccine was evaluated in 50 KTRs. A positive response was identified in 1 out of 8 (12.5%) SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated pretransplant, 3 out of 32 (9.4%) SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated posttransplant, and 9 out of 10 (90%) SARS-CoV-2 previously infected KTRs vaccinated posttransplant (Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C339>).

Interestingly, 76.9% (10 out of 13) of those who developed cellular immunity also developed a positive antibody response, but only 39.3% (10 out of 26) of those who developed humoral response also developed cellular immunity.

Logistic regression was further used to assess the factors determining the cellular response (Table S2, SDC, <http://links.lww.com/TP/C339>). Previous SARS-CoV-2 infection was identified as the only clear significant factor in univariable regression (OR, 87; $P < 0.001$). Multivariable regression was not performed because of a low number of events.

Durability of Pretransplant Vaccine-induced Antibodies

Thirty-five patients were vaccinated ahead of their kidney transplantation while still being on the waiting list. The baseline levels of vaccine-induced anti-SARS-CoV-2 antibodies (measured at day 0 of transplantation hospitalization immediately before transplantation) were

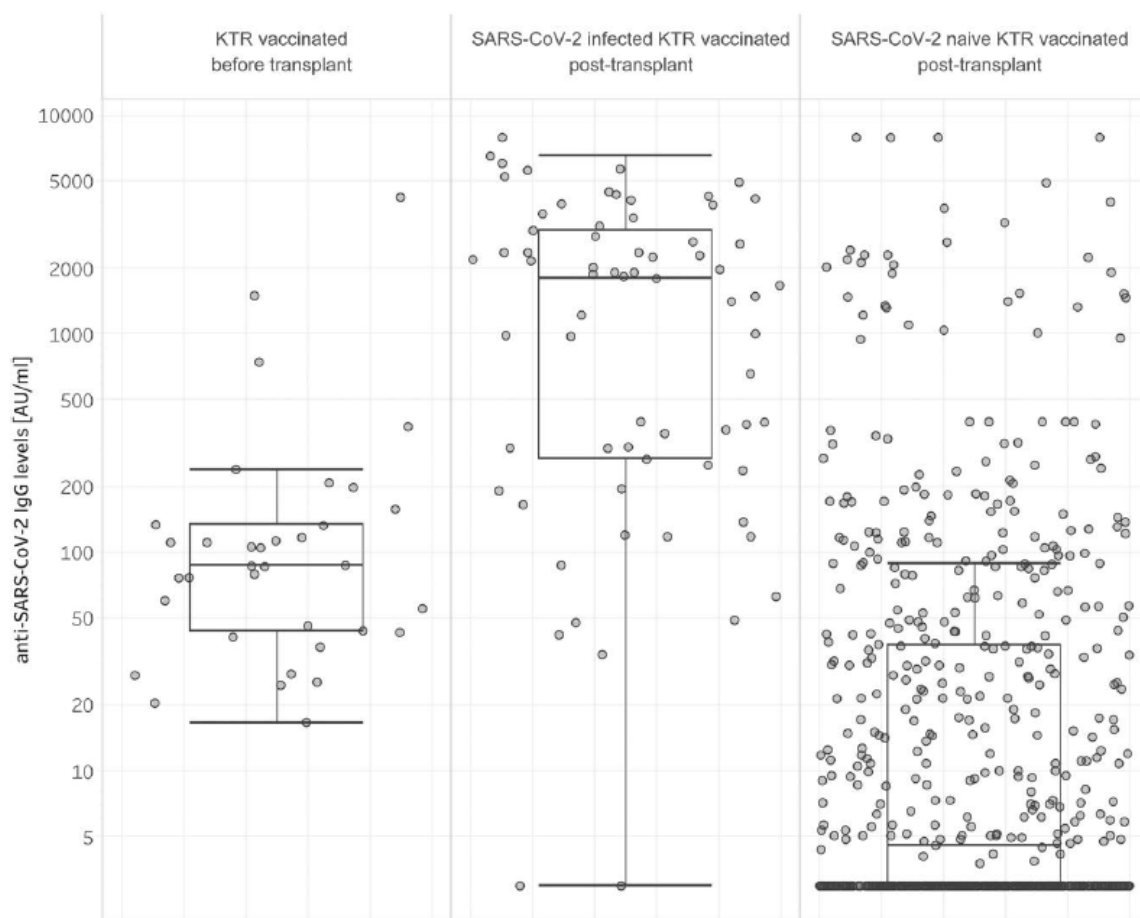


FIGURE 2. Anti-SARS-CoV-2 IgG levels according to previous virus infection and transplantation status. KTRs were divided into predefined groups according to the timing of the vaccination with regards to transplantation and previous SARS-CoV-2 infection to (1) KTRs vaccinated before transplant, all of whom were all SARS-CoV-2 naive; (2) SARS-CoV-2-infected KTRs vaccinated posttransplant; and (3) SARS-CoV-2-naïve KTRs vaccinated posttransplant. Statistical differences were assessed using the Kruskal-Wallis test; $P < 0.001$ for the overall model. Post hoc test revealed significant differences between the following groups: 1 and 2, $P = 0.019$; 1 and 3, $P < 0.001$; and 2 and 3, $P < 0.001$. IgG, immunoglobulin G; KTR, kidney transplant recipient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

measured in 28 of these patients. We analyzed the dynamics of antibody levels between the baseline levels at day 0 and a second later measurement. The median time of the second measurement from the day of transplantation was 20 d (IQR, 17–24 d). There was an apparent decrease in antibody levels between the 2 measurements (median, 136 AU/mL; IQR, 92–177.5 AU/mL at d 0 versus median, 83.8 AU/mL; IQR, 43.6–130 AU/mL; $P = 0.007$). In total, a decrease of >25% from the baseline was observed in 23 (82.1%) KTRs, whereas a decrease of >50% was observed in 7 (25%) KTRs (Figure S2, SDC, <http://links.lww.com/TP/C339>).

Early Durability of Posttransplant Vaccine-induced Antibodies

To estimate the early durability of vaccine-induced anti-SARS-CoV-2 antibodies, we compared the antibody levels in KTRs vaccinated after transplantation, in whom seroconversion after the second dose of mRNA vaccine was

achieved. KTRs were divided into 6 groups according to the length of the interval between the second dose of the vaccine and the time of antibody testing (<30 d, 30–60 d, and >60 d), and according to previous SARS-CoV-2 infection status (naïve and infected). Lower antibody levels were observed in SARS-CoV-2-naïve KTRs tested after >60 d, compared with those tested within 30 d after vaccination ($P = 0.035$). There were no significant differences between previously SARS-CoV-2-infected KTR groups (Figure 3).

Impact of COVID-19 Symptoms on Humoral Response

The severity of clinical symptoms of the 69 KTRs who contracted SARS-CoV-2 before vaccination was scored according to the Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection definition.¹⁸ Anti-SARS-CoV-2 IgG levels were significantly higher in patients who experienced moderate to severe symptoms compared with those who had an asymptomatic disease course ($P = 0.014$; Figure 4).

TABLE 3.
Characteristics of KTRs vaccinated posttransplant according to humoral response (n=695)

	Nonresponders (n=377)	Responders (n=318)	P ^a
Age (y), median (IQR)	66.5 (57.3–71.2)	60.8 (52.8–69.4)	<0.001
Sex (male), no. (%)	221 (58.6%)	222 (69.8%)	0.002
Previous infection with SARS-CoV-2, no. (%)	2 (0.5%)	67 (21.1%)	<0.001
BMI, median (IQR)	28.4 (24.9–31.4)	27.5 (24.9–31.1)	0.249
Diabetes, no. (%)	116 (30.8%)	87 (27.6%)	0.325
mRNA vaccine type (BNT162b2), no. (%) ^b	369 (97.9%)	294 (92.5%)	0.01
Tacrolimus-based IS, no. (%)	310 (82.2%)	249 (78.3%)	0.194
Cyclosporine-based IS, no. (%)	31 (8.2%)	41 (12.9%)	0.044
CNI-free IS, no. (%)	36 (9.5%)	28 (8.8%)	0.735
mTORi, no. (%)	18 (4.8%)	31 (9.7%)	0.011
MMF/MPA, no. (%)	326 (86.5%)	211 (66.4%)	<0.001
Costimulatory blocker, ^c no. (%)	10 (2.7%)	0 (0%)	0.002
Depleting induction, ^d no. (%)	170 (45.1%)	126 (39.6%)	0.146
Antirejection therapy, no. (%)	116 (30.8%)	107 (33.6%)	0.418
Depleting therapy in the last y ^d	25 (6.6%)	4 (1.3%)	<0.001
Time from transplant (mo), median (IQR)	54.8 (19–114.5)	91.8 (36.9–168.6)	<0.001
Time from second vaccine dose to antibody testing (d), median (IQR)	43 (29–67.5)	49 (29–67.3)	0.43
eGFR at the time of antibody testing	44.4 (32.7–57.9)	52.2 (40.1–67.8)	<0.001

^aP value for group comparison based on the Mann-Whitney U test for continuous variables and Pearson chi-square test or Fischer exact test for categorical variables; P<0.05 for significance.

^bThe rest of the KTRs were vaccinated with mRNA-1273.

^cBelatacept and iscalimab.

^dAntithymocyte globulin and rituximab.

BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IQR, interquartile range; IS, immunosuppression; KTR, kidney transplant recipient; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

TABLE 4.
Determinants of anti-SARS-CoV-2 IgG production after the second vaccine dose in KTRs vaccinated posttransplant

Multivariable model			
Variable	OR	95% CI	P
Previous infection with SARS-CoV-2	89.89	19.76–408.99	<0.001
Age (y)	0.96	0.94–0.98	<0.001
Sex (male)	1.97	1.33–2.93	0.001
Moderna mRNA-1273 vaccine	1.04	0.35–3.08	0.945
Time from transplant (mo)	1.007	1.004–1.01	<0.001
eGFR pretransplantation (mL/s)	1.034	1.023–1.044	<0.001
Pretransplantation diabetes	1.03	0.6–1.77	0.91
MMF/MPA	0.15	0.09–0.24	<0.001
Tacrolimus		Ref.	
Cyclosporine A	1.41	0.72–2.75	0.311
CNI-free	0.53	0.26–1.11	0.093
Depleting therapy in the last y ^a	0.19	0.05–0.8	0.023

Univariable regression results are to be seen in **Table S1 (SDC, <http://links.lww.com/TP/C339>)**.

^aAntithymocyte globulin and rituximab. The P value of variables that reached statistical significance are displayed in bold.

CI, confidence interval; CNI, calcineurin inhibitor; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IgG, immunoglobulin G; KTR, kidney transplant recipient; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; OR, odds ratio; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

DISCUSSION

The aim of this large prospective cohort study involving 736 subjects was to evaluate the immune response to SARS-CoV-2 vaccination in an immunocompromised population of KTRs. As observed in other recent reports, KTRs exhibit a severely impaired immune response to mRNA vaccines, which impacts both humoral and cellular immunities. We found that

patients who received vaccination while on the waiting list for kidney transplantation without immunosuppression and immunosuppressed KTRs who were naturally immunized by SARS-CoV-2 before vaccination mounted higher levels of SARS-CoV-2 antibodies than KTRs who were SARS-CoV-2 naive and vaccinated on immunosuppression. Furthermore, we identified several factors associated with poor antibody response to mRNA vaccination in KTRs, several of which could be potentially targeted to improve humoral response.

Of all KTRs vaccinated after transplantation, seroconversion after the second dose of an mRNA vaccine was reached only in 45.8% KTRs. Furthermore, if previous SARS-CoV-2 infection was considered, the seroconversion rate in the naive population was only 40.1%. This finding contrasts with a 100% seroconversion rate observed among KTRs vaccinated while on the waiting list and is consistent with some previous smaller reports. For example, Bertrand et al¹¹ demonstrated that in the cohort of 45 KTRs and 10 hemodialysis patients, the mRNA vaccine BNT162b2 induced antispike antibodies in 88.9% hemodialysis patients, compared with just 17.8% rate in KTRs. Although it had been reported that hemodialysis patients display a weaker antibody response to mRNA vaccination compared with healthy controls,^{19,20} the evidence from our study shows that these patients respond substantially better than KTRs on immunosuppression.^{7,21} However, it remains unclear how long will the waitlisted patients display sufficient immune protection after the start of posttransplant immunosuppression. In our study, most patients who were vaccinated while on the waiting list were repeatedly tested for antibodies following transplantation, and a significant decrease in antibody levels was observed in

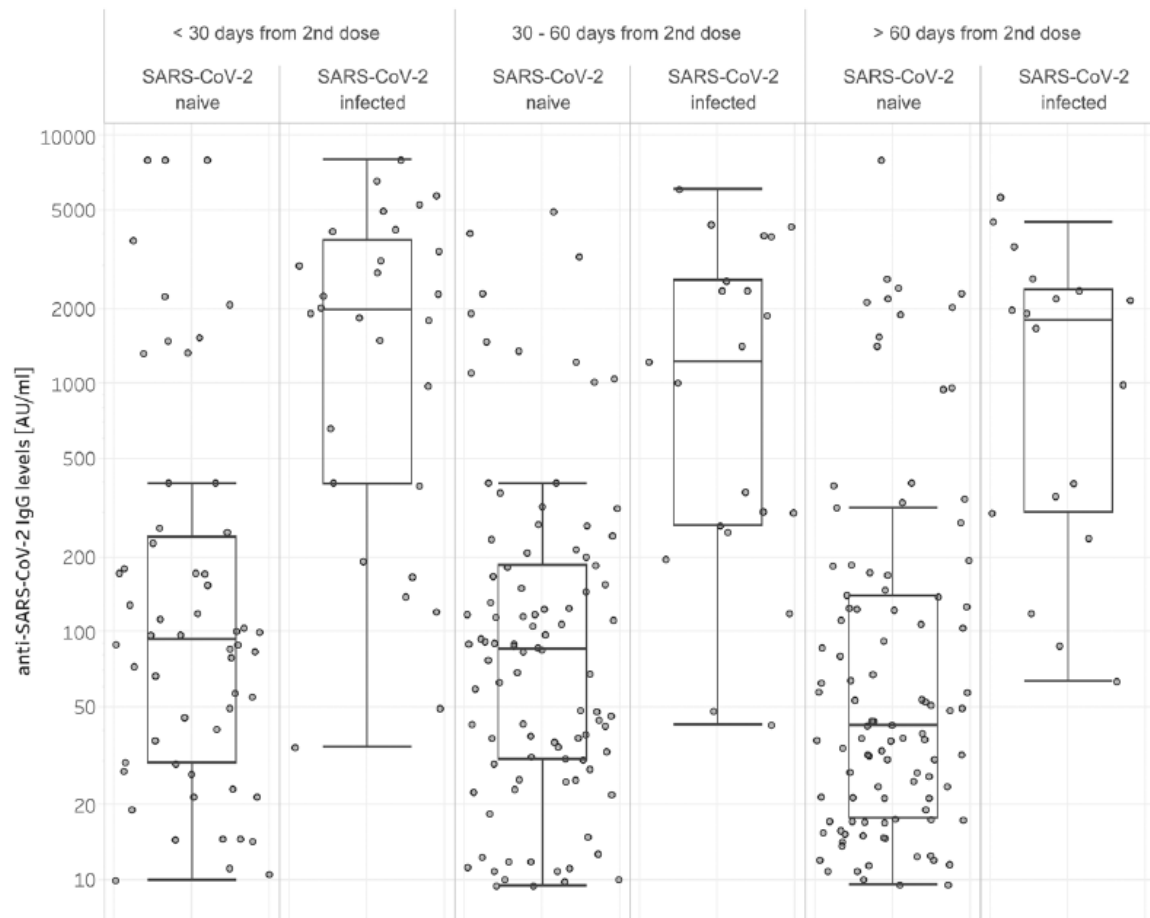


FIGURE 3. Anti-SARS-CoV-2 IgG levels over time. KTRs vaccinated after transplantation in whom seroconversion after the second dose of mRNA vaccine was observed were divided according to previous SARS-CoV-2 infection status and time from the second dose to antibody testing into 3 intervals (<30 d, 30-60 d, and >60 d from the second dose to testing, respectively). Lower antibody levels were observed in SARS-CoV-2-naïve KTRs tested >60 d in comparison with <30 d after vaccination, respectively ($P=0.035$). IgG, immunoglobulin G; KTR, kidney transplant recipient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

most of these patients when comparing the “day 0” levels and subsequent testing.

It is becoming clear that the immunosuppression burden following transplantation is a major cause of poor vaccine response to SARS-CoV-2 vaccines. Mycophenolate use in particular has been reported as potentially disruptive for vaccine efficacy.⁹ This observation is further supported by similar observations in influenza vaccination, where mycophenolate use was associated with reduced humoral immunity in a dose-dependent manner.^{22,23} The clear association between mycophenolate use and impaired humoral response poses the question of whether a temporary decrease in dosage or a complete withdrawal of mycophenolate ahead of vaccination would serve as a possible strategy to improve vaccine efficacy in KTRs, at least in patients at low risk of rejection or those at a high risk of severe course of COVID-19. However, such an approach would be problematic as KTRs should not be unnecessarily put at risk of rejection.

Based on the observation of poor humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines, it can be assumed that

COVID-19 still presents a major risk for vaccinated KTRs. Thus, it is of utmost importance to consider every tool available to protect this vulnerable population, including the continuation of standard regime measures such as social distancing and the use of face masks, vaccination of all waitlisted patients, healthcare providers, and household members, and to consider testing additional booster doses, which could be a promising tool to improve the immunogenicity of vaccines in solid organ recipients.²⁴⁻²⁶ Our results are also supportive of recently published expert recommendations.²⁷

Natural SARS-CoV-2 infection is described as a strong factor affecting the immune response after mRNA vaccination in the general population.¹⁴ It is well known that previously infected individuals develop higher anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and T-cell responses following mRNA vaccination.^{14,28-30} In this study, we observed that previous SARS-CoV-2 infection strongly enhances antibody production following vaccination, despite immunosuppression. Vaccination after natural infection has recently been termed as “hybrid immunity to SARS-CoV-2”

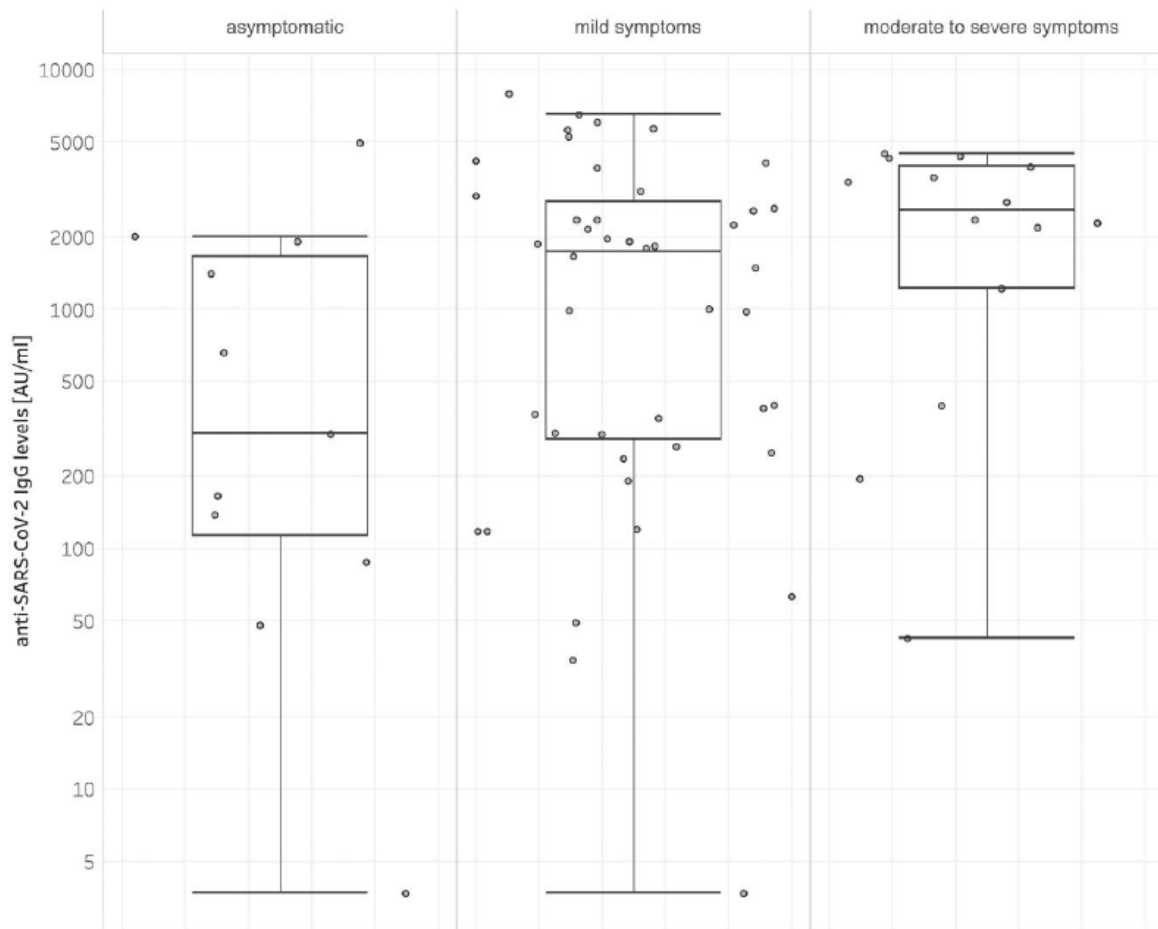


FIGURE 4. Impact of COVID-19 symptoms on anti-SARS-CoV-2 IgG levels after vaccination. KTRs who received vaccination after contracting SARS-CoV-2 were divided on the basis of the severity of clinical symptoms scored according to the Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection definition. Statistical differences were assessed using the Kruskal-Wallis test; $P=0.049$ for the overall model. Post hoc test revealed significant differences between asymptomatic KTRs and KTRs with moderate to severe symptoms ($P=0.014$). The differences between the other groups were not significant ($P=0.093$ for asymptomatic and mild symptoms, and $P=0.168$ for mild and moderate to severe symptoms). COVID-19, coronavirus disease 2019; IgG, immunoglobulin G; KTR, kidney transplant recipient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

and reported to be effective even among solid organ recipients in a previous report.³¹ Additionally, it seems that the magnitude of the humoral response is dependent on the severity of clinical symptoms, as KTRs who experienced moderate or severe disease course mounted higher levels of antibodies than asymptomatic individuals.

Furthermore, we recently showed that KTRs mounted a similar level of anti-SARS-CoV-2 antibodies compared with healthcare workers as a result of natural immunization.¹⁰ Using an identical antibody detection method in both studies, the observed SARS-CoV-2 antibody levels after a natural infection¹⁰ were lower than in KTRs who were first infected with SARS-CoV-2 and later received a vaccine. Therefore, mRNA vaccines may serve as a booster of the immune response primed by natural immunization when immunosuppression is absent or reduced. However, mRNA vaccines seem to be far less effective in priming immune responses in immunosuppressed populations. Furthermore, a heterologous approach combining different vaccines might also be a solution to this problem,³² but

so far, this approach has not been tested in a transplantation setting.

Interestingly, no patient on costimulatory inhibitors developed seroconversion after vaccination, including those with previous SARS-CoV-2 infection, who generally developed high antibody levels after vaccination. This observation is consistent with other recent reports.¹¹

In this study, we observed that a higher proportion of KTRs vaccinated with mRNA-1273 reached seroconversion, which is a similar finding to that of other reports of higher immunogenicity of mRNA-1273 vaccine in solid organ recipients³³ and the general population.³⁴ However, we believe that in our cohort, this was because of a higher representation of previously infected SARS-CoV-2 individuals. After adjustment in a multivariable model, there was no difference between these 2 vaccines, and thus we cannot recommend one over the other at this time.

Furthermore, to our knowledge, this is the first study to analyze the immune response to mRNA vaccines in a cohort of KTRs who were vaccinated while on the waiting

list. This was possible because of the high-volume program of our center and the short waiting time for a kidney transplant.³⁵

Among the limitations of our study is that, undoubtedly, there were KTRs who were falsely classified as naive to SARS-CoV-2 but were previously infected with the virus. To detect all previous infections, we decided to use the National Registry of Infectious Disease, where the records of every PCR test performed in the country because the first outbreak of COVID-19 are mandatorily reported. In other studies, participants were screened for SARS-CoV-2 antibodies. However, even serological screening has its limitations, as varying proportions of SARS-CoV-2 positive KTRs will not mount antibodies^{10,36} or the antibodies might decrease over time. Therefore, even individuals with negative SARS-CoV-2 antibodies might carry an immune memory and bias the measurements. We believe that our approach is a comparable alternative to serological screening in dividing SARS-CoV-2-naive and previously infected individuals.

In conclusion, SARS-CoV-2-naive patients who received both doses of mRNA vaccines while on the waiting list mounted good humoral immune response, which was preserved in the first month following kidney transplantation, contrary to poor response in immunosuppressed KTRs naive to SARS-CoV-2. In contrast, survivors of COVID-19 exhibit abundant humoral and cellular responses to mRNA vaccines despite receiving immunosuppression.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Olga Kaucka and Marie Kolarova for their help with the collection of the biological material, Adela Sucha for their help with data collection and technical support, and Hedvika Cacarova for proofreading.

REFERENCES

- Akalin E, Azzi Y, Bartash R, et al. Covid-19 and kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2020;382:2475–2477.
- Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021;397:1819–1829.
- Amit S, Regev-Yochay G, Afek A, et al. Early rate reductions of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 in BNT162b2 vaccine recipients. *Lancet*. 2021;397:875–877.
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383:2603–2615.
- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al; COVE Study Group. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384:403–416.
- Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med*. 2020;383:2439–2450.
- Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA, et al. Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV-2 BNT162b2 (tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J Clin Invest*. 2021;131:150175.
- Devresse A, Saad Albichr I, Georgery H, et al. T-cell and antibody response after 2 doses of the BNT162b2 vaccine in a Belgian cohort of kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2021;105:e142–e143.
- Rozen-Zvi B, Yahav D, Agur T, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine among kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27:1173.e1–1173.e4.
- Magicova M, Fialova M, Zahradka I, et al. Humoral response to SARS-CoV-2 is well preserved and symptom dependent in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21:3926–3935.
- Bertrand D, Hamzaoui M, Lemée V, et al. Antibody and T cell response to SARS-CoV-2 messenger RNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32:2147–2152.
- Cucchiari D, Egri N, Bodro M, et al. Cellular and humoral response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21:2727–2739.
- Georgery H, Devresse A, Yombi J-C, et al. Disappointing immunization rate after 2 doses of the BNT162b2 vaccine in a Belgian cohort of kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2021;105:e283–e284.
- Anichini G, Terrosi C, Gandolfo C, et al. SARS-CoV-2 antibody response in persons with past natural infection. *N Engl J Med*. 2021;385:90–92.
- Havlin J, Svorcova M, Dvorackova E, et al. Immunogenicity of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and SARS-CoV-2 infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40:754–758.
- Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, et al. Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2-neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *J Clin Microbiol*. 2020;58:e01224–20.
- The National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:1390–1400.
- National Institutes of Health. Clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection. *COVID-19 Treatment Guidelines Panel*. 2021. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>. Accessed September 25, 2021.
- Simon B, Rubey H, Treipl A, et al. Haemodialysis patients show a highly diminished antibody response after COVID-19 mRNA vaccination compared with healthy controls. *Nephrol Dial Transplant*. 2021;36:1709–1716.
- Grupper A, Sharon N, Finn T, et al. Humoral response to the Pfizer BNT162b2 vaccine in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16:1037–1042.
- Danthu C, Hantz S, Dahlem A, et al. Humoral response after SARS-CoV-2 mRNA vaccination in a cohort of hemodialysis patients and kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32:2153–2158.
- Baluch A, Humar A, Eurich D, et al. Randomized controlled trial of high-dose intradermal versus standard-dose intramuscular influenza vaccine in organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013;13:1026–1033.
- Egli A, Humar A, Widmer LA, et al. Effect of immunosuppression on T-helper 2 and B-cell responses to influenza vaccination. *J Infect Dis*. 2015;212:137–146.
- Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2021;385:661–662.
- Stumpf J, Tonnus W, Paliege A, et al. Cellular and humoral immune responses after 3 doses of BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant. *Transplantation*. 2021;105:e267–e269.
- Alejo JL, Mitchell J, Chiang TPY, et al. Antibody response to a fourth dose of a SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: a case series. *Transplantation*. 2021;105:e280–e281.
- American Society of Transplantation. *Updated Joint AST/ASTS/ISHLT Statement about vaccine efficacy in organ transplant recipients*. 2021. Available at <https://www.myast.org/statement-covid-19-vaccination-solid-organ-transplant-recipients>. Accessed July 14, 2021.
- Saadat S, Rikhtegaran Tehrani Z, Logue J, et al. Binding and neutralization antibody titers after a single vaccine dose in health care workers previously infected with SARS-CoV-2. *JAMA*. 2021;325:1467–1469.
- Stamatatos L, Czartoski J, Wan YH, et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*. 2021;372:1413–1418.
- Reynolds CJ, Pade C, Gibbons JM, et al. Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science*. 2021;372:1418–1423.
- Boyersky BJ, Barbur I, Chiang TP, et al. SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine immunogenicity in solid organ transplant recipients with prior COVID-19. *Transplantation*. 2021;105:e270–e271.
- Barros-Martins J, Hammerschmidt SI, Cossmann A, et al. Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Net Med*. 2021;27:1525–1529.

33. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2021;325:2204–2206.
34. Steensels D, Pierlet N, Penders J, et al. Comparison of SARS-CoV-2 antibody response following vaccination with BNT162b2 and mRNA-1273. *JAMA*. 2021;326:1533–1535.
35. Vilkicky O, Fronek J, Trunecka P, et al. Organ transplantation in the czech republic. *Transplantation*. 2017;101:2259–2261.
36. Burack D, Pereira MR, Tsapepas DS, et al. Prevalence and predictors of SARS-CoV-2 antibodies among solid organ transplant recipients with confirmed infection. *Am J Transplant*. 2021;21:2254–2261.

6.3 Vliv frailty syndromu na protilátkovou odpověď po očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2 u pacientů vyššího věku po transplantaci ledviny

6.3.1 Úvod

Vyšší věk je jedním z faktorů negativně ovlivňujících humorální odpověď na očkování proti SARS-CoV-2. Možný vliv frailty syndromu (česky syndrom geriatrické křehkosti) na oslabenou postvakcinační protilátkovou odpověď u transplantované populace je nejasný. Cílem studie byla analýza humorální imunitní odpovědi po očkování mRNA vakcínami u pacientů vyššího věku po transplantaci ledviny.

6.3.2 Metodika

Tato studie je sekundární analýzou prospektivní studie týkající se imunitní odpovědi na mRNA vakcíny v naší kohortě pacientů po transplantaci ledviny (Magicova M. et al., 2022). Ve studii bylo analyzováno 101 virus-naivních pacientů ve věku 70 let a starších sledovaných v našem centru, kteří absolvovali základní očkování (tj. 2 dávky) vakcínou BNT162b2. Všichni pacienti byli očkováni po transplantaci ledviny. U pacientů byly měřeny IgG protilátky proti S1 a S2 podjednotkám spike proteinu viru SARS-CoV-2 metodou chemiluminiscenční imunoanalýzy. U všech studovaných subjektů byl v den sérologického testování vyhodnocen status frailty (syndrom geriatrické křehkosti) na základě kritérií podle Friedové (Fried L. P. et al., 2001): 1. nechtěný úbytek hmotnosti, 2. fyzická inaktivita, 3. síla stisku ruky, 4. vyčerpání, 5. pomalá chůze. Absence těchto kritérií je definována jako status non-frail, přítomnost maximálně dvou kritérií jako pre-frail, u frail pacientů byla splněna minimálně tři kritéria. V modelu multivariabilní regresní analýzy byly kromě statusu frailty a jeho kritérií zahrnuty i proměnné (vyjma věku a depleční léčby), které byly v primární studii asociovány s protilátkovou odpovědí po očkování. Protože všichni pacienti byli staršího věku, navíc s malým věkovým rozdílem a žádný z nich nebyl léčen depleční terapií v posledním roce, tyto proměnné analyzovány nebyly.

6.3.3 Výsledky

Prevalence frail pacientů v studijní kohortě byla 26 % a pre-frail pacientů 48 %. Ze všech subjektů byla sérokonverze po očkování 2 dávkami mRNA vakcíny BNT162b2 pozorována jen u 33 % pacientů. K sérokonverzi došlo u 44 % non-frail, 31 % pre-frail a 23 % frail pacientů po transplantaci ledviny.

V univariabilní analýze věk v této kohortě neměl vliv na sérokonverzi (OR 1,07, 95% CI 0,95–1,2, $p = 0,267$). V multivariabilní regresní analýze byly negativními faktory sérokonverze status pre-frail (OR 0,27, 95% CI 0,07–1,00, $p = 0,05$) a frail (OR 0,14, 95% CI 0,03–0,73, $p = 0,019$). S lepší humorální odpovědí po očkování byla asociována delší doba od transplantace (OR 2,92, 95% CI 1,19–7,18, $p = 0,019$) a imunosuprese bez mykofenolát mofetilu (OR 10,14, 95% CI 2,83–36,25, $p < 0,001$). Z jednotlivých kritérií syndromu frailty podle Friedové (Fried L. P. et al., 2001) byla v univariabilní analýze fyzická inaktivita jako jediná signifikantně spojena s horší sérokonverzí po očkování (OR 0,36, 95% CI 0,14–0,95, $p = 0,039$).

6.3.4 Diskuse

Vyšší věk příjemců je rizikovým faktorem pro vznik infekčních komplikací po transplantaci ledviny (Jackson K. R. et al., 2021). V norské studii byl věk nad 70 let u příjemců po transplantaci asociován s více než 6krát vyšším rizikem úmrtí na covid-19 ve srovnání s mladšími pacienty (Hovd M. et al., 2023). Z předchozích studií víme, že vyšší věk je rovněž významným negativním faktorem imunitní odpovědi na očkování proti SARS-CoV-2, a to nejen v obecné (Romero-Olmedo A. J. et al., 2022), ale také v transplantované populaci (Grupper A. et al., 2021, Arias-Cabrales C. et al., 2023).

Naším cílem bylo zjistit, zda existuje vztah mezi horší odpovědí na mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 a syndromem frailty u starších pacientů po transplantaci ledviny, kteří tvoří nemalou část této populace. Věk 70 let a více jako vstupní kritérium byl zvolen na základě klinické praxe, protože právě od tohoto věku je frailty status vyhodnocován v našem transplantčním centru u všech potenciálních kandidátů transplantace ledviny.

Hodnocení frailty neboli syndromu geriatrické křehkosti je v souvislosti se starší populací využíváno v klinické praxi. Tento klinický syndrom je nezávislým prediktorem hospitalizace a mortality (Fried L. P. et al., 2001). U frail pacientů po transplantaci ledviny je riziko potransplantační mortality dvakrát vyšší oproti non-frail pacientům (McAdams-DeMarco M. A. et al., 2015). Několik studií zkoumalo možný vliv frailty na imunogenicitu vakcín u obecné populace. Data týkající se očkování proti chřipce v souvislosti s frailty jsou rozporuplná (Yao X. et al., 2011, Moehling K. K. et al., 2020). V případě očkování proti SARS-CoV-2 mRNA vakcínami u netransplantované populace nebyla prokázána asociace frailty s nižší imunogenicitou vakcín (Salmerón Ríos S. et al., 2021). Dosud však žádná studie

neanalyzovala syndrom frailty v souvislosti s očkováním proti SARS-CoV-2 u příjemců po orgánových transplantacích.

Z celé studijní kohorty byla sérokonverze po očkování pozorována jen u třetiny. V případě pacientů v kategorii frail to bylo dokonce jen 23 %. Pro srovnání, v primární studii (Magicova M. et al., 2022), kde byli zahrnuti i mladší, taktéž virus-naivní jedinci, indukovalo očkování tvorbu protilátek ve 40 % případů. Zdá se však, že u pacientů starších 70 let nemá věk dále vliv na sérokonverzi, jak jsme ukázali v této studii.

Zjistili jsme, že frail status je signifikantně asociován s horší sérokonverzí po očkování. Naše výsledky jsou v rozporu se španělskou studií týkající se netransplantované populace (Salmerón Ríos S. et al., 2021), nicméně jejich data mohou být ovlivněna tím, že do studie zahrnuli i pacienty s dříve prodělanou infekcí SARS-CoV-2, která, jak je známo, indukuje vyšší titry protilátek po vakcinaci (Manisty C. et al., 2021, Boyarsky B. J. et al., 2021). Dalším významným negativním faktorem postvakcinační odpovědi byl v naší studii mykofenolát mofetil. U frail pacientů léčených mykofenolátem jsme pozorovali sérokonverzi pouze v 17 % případů, naopak u non-frail pacientů, kteří nebyli léčeni mykofenolátem (n = 4), došlo k sérokonverzi ve všech případech.

Z jednotlivých komponent frailty byla fyzická inaktivita jediným faktorem spojeným s horší tvorbou protilátek po vakcinaci. Podobně Schuler prokázal u starších pacientů očkovaných proti chřipce korelaci mezi fyzickou aktivitou a lepší tvorbou protilátek po vakcinaci (Schuler P. B. et al., 2003). U mladých zdravých jedinců s pravidelnou fyzickou aktivitou může být protilátková odpověď po očkování proti chřipce a SARS-CoV-2 posílena dokonce i 90minutovým cvičením bezprostředně po vakcinaci (Hallam J. et al., 2022). Avšak ve skupině starších jedinců ve věku 62 až 87 let nebyl patrný rozdíl mezi 45minutovým cvičením a fyzickou inaktivitou po očkování. Jedním z možných vysvětlení pozitivního vlivu fyzické aktivity na postvakcinační protilátkovou odpověď je zvýšená produkce IFN- α plasmacytoidními dendritickými buňkami (Hallam J. et al., 2022) a následná aktivace mechanismů adaptivní imunity.

Jednou z možností, jak zlepšit imunogenicitu vakcín u imunosuprimované populace, je aplikace posilovacích dávek (Arias-Cabrales C. et al., 2023, Thomson T. et al., 2022, Kemlin D. et al., 2023). Vyšší věk pacientů po transplantaci ledviny je však i přes očkování booster dávkou spojen s horší sérokonverzí (Kemlin D. et al., 2023). Nicméně u imunokompetentních jedinců starších 80 let vedlo očkování 3. dávkou ke zlepšení jak buněčné, tak humorální odpovědi (Romero-Olmedo A. J. et al., 2022).

Limitací této studie je chybějící validační kohorta. Rovněž nebyla analyzována odpověď T-lymfocytů, jejichž role v imunitní odpovědi po očkování je nezbytná. Na druhou stranu tato studie jako první prokázala negativní vliv frailty na protilátkovou odpověď po očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2 v transplantované populaci.

Závěr

Syndrom frailty je u pacientů vyššího věku po transplantaci ledviny, kteří neprodělali covid-19, spojen s porušenou humorální odpovědí po očkování mRNA vakcínami proti SARS-CoV-2.

Článek byl publikován v časopise International Urology and Nephrology.

The impact of frailty syndrome on humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in older kidney transplant recipients. *Int Urol Nephrol.* 2023 Nov;55(11):2959-2965.

Kompletní článek je přiložen v anglickém jazyce.



The impact of frailty syndrome on humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in older kidney transplant recipients

Michal Schmalz^{1,5} · Hana Vankova⁵ · Silvie Rajnochova-Bloudickova¹ · Petra Hrubá⁴ · Martina Fialova² · Jiri Gurka³ · Maria Magicova¹ · Ilja Striz² · Ivan Zahradka¹ · Ondrej Viklicky^{1,4}

Received: 1 November 2022 / Accepted: 11 March 2023 / Published online: 7 April 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Purpose Advanced age is associated with an impaired humoral immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in kidney transplant recipients (KTR). The mechanisms are, however, poorly understood. Frailty syndrome assessment may determine the most vulnerable population.

Methods This study is a secondary analysis of a prospective study (NCT04832841) regarding seroconversion after BNT162b2 vaccination, including 101 SARS-CoV-2 naïve KTR 70 years and older. The Fried frailty components were evaluated, and antibodies against S1 and S2 subunits of SARS-CoV-2 were examined > 14 days after the second dose of BNT162b2 vaccine.

Results Seroconversion was observed in 33 KTR. Male gender, eGFR, MMF-free immunosuppression, and a lower frailty score were associated with higher seroconversion rates in univariable regression. Concerning frailty components, physical inactivity had the most negative effect on seroconversion (OR = 0.36, 95% CI 0.14–0.95, $p = 0.039$). In a multivariable regression adjusted for eGFR, MMF-free immunosuppression, time from transplant and gender, pre-frail (OR = 0.27, 95% CI 0.07–1.00, $p = 0.050$), and frail status (OR = 0.14, 95% CI 0.03–0.73, $p = 0.019$) were associated with an increased risk of unresponsiveness to SARS-CoV-2 vaccines.

Conclusion Frailty was associated with an impaired humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in older SARS-CoV-2 naïve KTR.

Trial registration This study is registered under the identifier NCT04832841 on ClinicalTrials.gov.

Keywords Frailty · Kidney transplantation · SARS-CoV-2 infection · Vaccination

Abbreviations

AU Arbitrary units
BMI Body mass index

CNI Calcineurin inhibitor
COVID-19 Coronavirus disease 2019
eGFR Estimated glomerular filtration rate
IgG Immunoglobulin G
IS Immunosuppression
IU International units
KTR Kidney transplant recipients
PCR Polymerase chain reaction
MMF Mycophenolate mofetil
mRNA Messenger ribonucleic acid
SARS-CoV-2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SPSS Statistical package for the social sciences

Michal Schmalz, Hana Vankova and Silvie Rajnochova-Bloudickova contributed equally to this work.

✉ Ondrej Viklicky
ondrej.viklicky@ikem.cz

¹ Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

² Department of Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³ Information Technology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁴ Transplantation Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁵ The Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Introduction

Kidney transplant recipients (KTR) are considered at high risk for COVID-19 infection-associated morbidity and mortality [1]. Vaccination of this vulnerable population has, therefore, been recommended. However, recent studies have revealed a significantly impaired humoral response to mRNA vaccines in KTR compared to the general population [2]. The use of mycophenolate mofetil, depletive induction therapy, and costimulation blockade, as well as older age were found to be among the main risk factors of limited humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines [3–5].

With improvements in KTR survival rates [6], elderly patients constitute a significant part of the KTR population. Elderly patients are at higher risk for infectious complications, which is frequently further aggravated by frailty syndrome [7]. Frailty syndrome, characterized by decreased physiologic reserve and resistance to stressors, further increases COVID-19-associated morbidity and mortality [1, 8].

Some previous studies have considered frailty a risk factor for decrease in flu vaccine effectiveness in the general population [9]. However, their findings are conflicting [10, 11]. Currently available data concerning the effect of frailty on seroconversion rates after SARS-CoV-2 vaccination in the general population are limited, and to the best of our knowledge, no study has yet pointed toward an association between frailty and impaired seroconversion in KTR [12]. We, therefore, aimed to assess the humoral response following vaccination with the mRNA SARS-CoV-2 vaccine (BNT162b2) in frail and non-frail elderly kidney transplant recipients.

Methods

Study design

This is a secondary analysis of a prospective single-center study (NCT04832841) performed in 2021 (April–June) [5]. Our objective is to assess the seroprevalence of anti SARS-CoV-2 S1/S2 IgG assessment following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in KTR. Frailty assessment was offered to KTR 70 years and older who were SARS-CoV-2 naïve and had received two doses of mRNA BNT162b2 vaccine. Antibody testing was done at least 14 days after the second dose of BNT162b2 vaccine. Other inclusion and exclusion criteria and a description of antibody testing have already been reported [5, 13]. Finally, 103 KTRs were enrolled in the study (Fig. 1). Two KTR were excluded due to a positive SARS-CoV-2 PCR test following the first vaccine dose and eighty-two KTR declined frailty assessment.

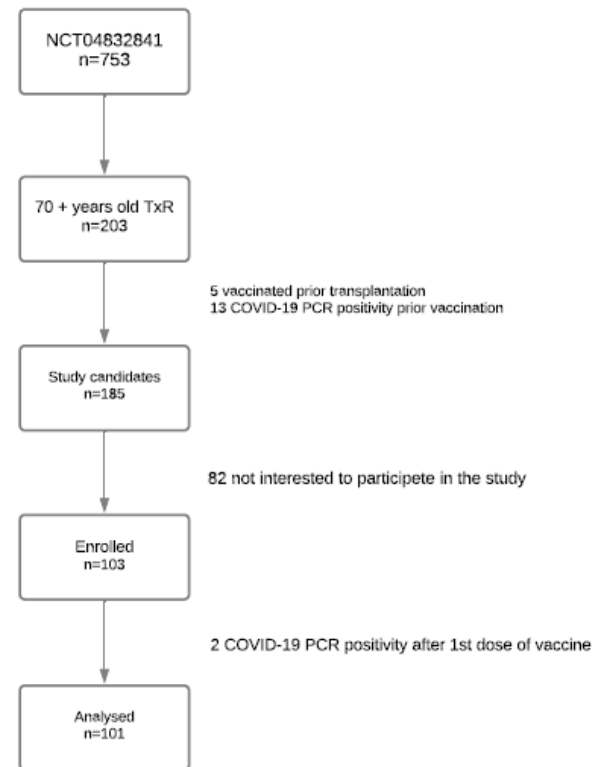


Fig. 1 Study flowchart. A total of 203 kidney transplant recipients (KTR) from the original study (NCT04832841) were 70 and more years old. Five KTR were vaccinated while on the waiting list prior to transplantation, thirteen were COVID-19 positive prior to vaccination and eighty-two KTR were enrolled in the original study but were not interested to participate in the frailty assessment. A total of 103 KTR were enrolled in this study and of them 2 experienced COVID-19 PCR positivity after the 1st vaccine dose. Thus, a total of 101 KTR were included in the final analysis

Frailty assessment

Frailty was evaluated according to Fried frailty criteria and on the same day, blood samples for antibody testing were collected. Frailty was determined based on five components: weight loss (self-reported unintentional weight loss of more than 10 lbs in the past year); weakness (grip strength below an established cutoff based on gender and BMI); exhaustion (self-reported); physical inactivity (kcal/week below an established cutoff); slower walking speed (walking time of 15 feet below an established cutoff by gender and height) [8]. Each of the five components was scored 0 or 1 depending on the absence or the presence of the component, respectively. The cumulative Fried frailty score was calculated as the sum of the component scores (range 0–5). Non-frail status was defined as a score of 0, pre-frail status was defined as

Table 1 General characteristics of the study cohort

	Study cohort, <i>n</i> = 101
Male sex—no. (%)	51 (50%)
Age in years—median (min–max)	73 (70–82)
Number of transplant (1st/2nd/3rd)—no. (%)	95(94%)5(5%)1(1%)
BMI—median (min–max)	28.4 (16–41)
Living donor—no. (%)	6 (6%)
Time from transplant in years—median (min–max)	6.2 (0.5–26.6)
Dialysis vintage in years—median (min–max)	2 (0.6–8)
Diabetes mellitus—no. (%)	42 (42%)
eGFR in ml/min/1.73m ² —median (min–max) ^a	46.2 (10.2–94.8)
CNI-based IS—no. (%)	85 (84%)
Tacrolimus based IS—no. (%)	71 (70%)
CyA based IS—no. (%)	14 (14%)
MMF / MPA—no. (%)	75 (74%)
mTORi—no. (%)	13 (13%)
Depletive induction—no. (%)	37 (37%)
Anti-rejection therapy—no. (%)	19 (19%)
Time from 2nd dose to Ab testing in days—median (min–max)	66 (19–114)

BMI body mass index, CNI-based calcineurin inhibitor-based, CyA cyclosporin A, MMF mycophenolate mofetil, MPA mycophenolic acid, mTORi mammalian target of rapamycin inhibitor

^aSerum creatinine measurements were done on the day of antibody testing

a score of 1–2, and frail status was defined as a score of 3 and higher [8].

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as medians (min, max) and categorical variables are expressed as *n* and a percentage of the total and compared by Pearson Chi-square test. Univariable and multivariable binary regression analyses were used to predict the responsiveness to SARS-CoV-2 vaccination. The multivariable binary logistic regression

model was based on the multivariable model of the primary study and included a variable for frailty as well as variables which were previously found to be independently associated with vaccine immune response. The independent variables associated with vaccine immune response in the primary study were age, gender, time from transplant to vaccination, eGFR, mycophenolate use, and depleting therapy in the last year [5]. However, age was not included in the current final model, as all the KTR were elderly within few years of each other. Furthermore, no elderly KTR received depleting therapy in the last year,

Table 2 Comparison of the frailty characteristic of responders and non-responders to SARS-CoV-2 mRNA vaccination

	Non-responders (<i>n</i> = 68)	Responders (<i>n</i> = 33)	<i>p</i> value ^a
<i>Frailty phenotype</i>			0.243
Non-frail status—no. (%)	15 (22%)	12(44%)	
Pre-frail status—no. (%)	33 (49%)	15 (45%)	
Frail status—no. (%)	20 (29%)	6 (18%)	
<i>Fried frailty components</i>			
1 Physical inactivity—no. (%)	29 (43%)	7 (19%)	0.046
2 Weakness—no. (%)	21 (31%)	8 (24%)	0.640
3 Slowed walking speed—no. (%)	16 (24%)	8 (24%)	1
4 Exhaustion—no. (%)	34 (50%)	11 (33%)	0.138
5 Weight loss—no. (%)	9 (13%)	3 (9%)	0.747
Fried cumulative score (0–5)—mean (standard deviation)	1.6 (1.33)	1.12 (1.29)	0.051

mRNA messenger ribonucleic acid, SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

^a*p* values for group comparison based on the Mann–Whitney *U* test for continuous variables, Pearson's Chi-squared test for categorical variables, *p* < 0.05 for significance

Table 3 Determinants of seroconversion in elderly SARS-CoV-2 naïve KTR, univariable analysis

Univariable analysis ^a			
Variable	OR	95% CI	<i>p</i> value
Gender (male)	2.09	0.89–4.9	0.091
Age (years)	1.07	0.95–1.2	0.267
Retransplantation	2.17	0.41–11.37	0.361
BMI	1.01	0.94–1.09	0.741
Living donor	1.03	0.18–5.95	0.972
Time after transplant (years)	1.04	0.99–1.01	0.118
Dialysis vintage before transplant (years)	0.82	0.62–1.08	0.152
Diabetes mellitus	0.68	0.29–1.61	0.380
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	1.03	1.01–1.06	0.001
CNI-based IS	0.22	0.07–0.68	0.009
Tacrolimus based IS	0.34	0.14–0.83	0.018
CyA based IS	1.17	0.36–3.8	0.794
MMF-free immunosuppression	4.32	1.69–11.07	0.002
mTORi	4.03	1.21–13.52	0.024
Depletive induction	0.43	0.17–1.09	0.076
Antirejection therapy	1.26	0.44–3.56	0.668
Time from second vaccine dose to antibody testing (days)	1.01	0.99–1.02	0.500
Fried Frailty cumulative score ^b	0.74	0.52–1.05	0.091
Non-frail status	Reference category		
Pre-frail status	0.57	0.22–1.51	0.255
Frail status	0.38	0.11–1.23	0.105

CI confidence interval, MMF mycophenolate mofetil, mRNA messenger ribonucleic acid, SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, eGFR estimated glomerular filtration rate, OR odds ratio

^aUnivariable associations were calculated by binary logistic regression, results are expressed with odds ratios and their 95% confidence intervals, *p* < 0.05 for significance

^bFried Frailty cumulative score inputted as a continuous variable

and thus this variable could also not be included. Aside from mycophenolate use, no other immunosuppression variable was entered into the model, as none were independently associated with vaccine response in the original study. Sensitivity analyses of multivariable binary logistic regression model was calculated using bootstrap resampling. Additional sensitivity analysis was performed where all statistically significant variables in univariable regression were also included in the multivariable model. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. There were no missing data of variables of interest. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics, Version 24 (International Business Machines Corp.) and R-studio version 4.0.3. (2020-10-10).

Results

A total of 101 elderly KTR naïve to COVID-19 were included in the analysis. Males and females were represented equally. The median age was 73 years, most patients had undergone the first transplantation, and the median follow-up from transplantation was 6.2 years. Details on demography and immunosuppression are provided in Table 1. In the entire cohort, seroconversion after two doses of mRNA BNT162b2 vaccine was observed in 33% KTRs who were older than 70 years of age.

Twenty-seven (27%) patients were classified as frail and forty-eight (48%) patients as pre-frail. General characteristics of patients divided by frailty status are provided in the Supplementary Table 1. Exhaustion (45%) and physical inactivity (36%) were the most frequently observed Fried frailty components. Weakness, slow walking speed, and weight loss were observed in 29%, 24%, and 12%, respectively. Seroconversion after vaccination was observed in 12 out of 27 (44%) non-frail, 15 out of 48 (31%) pre-frail, and 6 out of 26 (23%) frail KTR, respectively. Interestingly, there were 36 (36%) KTR who were physically inactive, and 29 of them (80%) did not mount antibodies after vaccination (*p* = 0.046) (Table 2).

Seroconversion was further used as the dependent variable for univariable and multivariable binary logistic regression. The variables associated with seroconversion in univariable regression were eGFR (OR = 1.03, 95% CI 1.01–1.06, *p* = 0.001), MMF-free immunosuppression (IS) regimen (OR = 4.32, 95% CI 1.69–11.07, *p* = 0.002), CNI-based IS (OR = 0.22, 95% CI 0.07–0.68, *p* = 0.009), and mTOR inhibitor IS (OR = 4.03, CI 1.21–13.52, *p* = 0.024). Male gender (OR = 2.09, 95% CI 0.89–4.9, *p* = 0.091), depletive induction IS (OR = 0.43, CI 0.17–1.09, *p* = 0.076), and Fried frailty cumulative score (OR = 0.74, 95% CI 0.52–1.05, *p* = 0.09) did not reach statistical significance. Age did not affect seroconversion in our cohort (OR = 1.07, 95% CI 0.95–1.2, *p* = 0.267) (Table 3).

Next, a multivariable binary logistic regression model was calculated. Pre-frail (OR = 0.27, 95% CI 0.07–1.00, *p* = 0.050) and frail (OR = 0.14, 95% CI 0.03–0.73, *p* = 0.019) status were associated with an increased risk of unresponsiveness to SARS-CoV-2 vaccination. The model was adjusted for eGFR (OR = 1.05, 95% CI 1.02–1.08, *p* < 0.001), MMF-free immunosuppression (OR = 10.14, 95% CI 2.83–36.25, *p* < 0.001), longer time from transplant (OR = 2.92, 95% CI 1.19–7.18, *p* = 0.019), and gender (Fig. 2). The stability of confidence intervals of all variables in the multivariable binary logistic regression model was checked internally using bootstrap resampling (*n* = 1000; Supplementary Table 2). Furthermore, an additional sensitivity analysis was performed where

Fig. 2 Determinants of seroconversion after two-dose mRNA vaccination in elderly kidney transplant recipients. Results displayed as a Forest plot (log scale) with adjusted odds ratios and their 95% confidence intervals

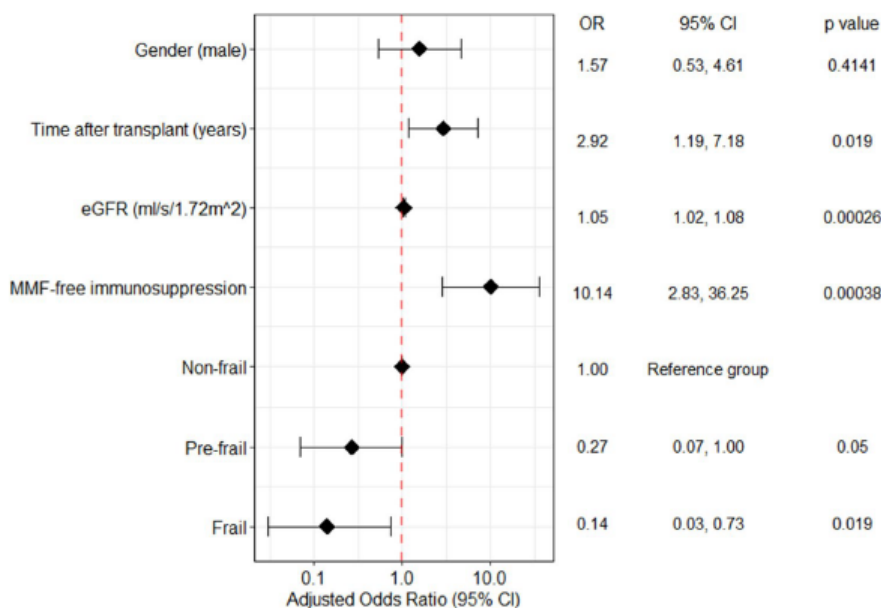


Table 4 Univariable associations of individual frailty components with seroconversion rate

Univariable analysis ^a			
Variable	OR	95% CI	p value
Physical inactivity	0.36	0.14–0.95	0.039
Weight loss	0.68	0.17–2.69	0.581
Weakness	0.72	0.28–1.85	0.404
Exhaustion	0.50	0.21–1.19	0.117
Slow walking speed	1.04	0.39–2.75	0.937

CI confidence interval, mRNA messenger ribonucleic acid, SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, OR odds ratio

^aUnivariable associations were calculated by binary logistic regression, results are expressed with odds ratios and their 95% confidence intervals, $p < 0.05$ for significance

all statistically significant variables in univariable regression were also included in the multivariable model. This approach did not alter the study results (Supplementary Table 3).

Furthermore, Fried frailty components were separately analyzed in univariable regression (Table 4). The most significant negative impact on seroconversion was observed for physical inactivity (OR 0.36, 95% CI 0.14–0.95, $p = 0.039$). Weakness (hand grip strength) alone did not affect seroconversion; however, better seroconversion was observed in KTR with a higher absolute

value of maximal hand grip strength (OR = 1.05, CI 95% 1.01–1.11, $p = 0.045$).

Discussion

In this study, we aimed to evaluate the association between frailty and an impaired humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in elderly virus-naïve KTR. We observed a better seroconversion rate in the non-frail group, compared to the pre-frail and frail KTR groups. Furthermore, of the Fried frailty components, physical inactivity had the most negative impact on seroconversion.

Frailty was assessed using Fried frailty criteria, which were previously validated by McAdams-DeMarco in KTR [14]. The prevalence of frailty syndrome was studied in kidney transplant candidates, but less is known about the long-term frailty prevalence in KTR. The group of McAdams-DeMarco observed that 23.7% kidney transplant candidates 65–75 years old and 22.7% transplant candidates older than 75 years old are frail at the time of transplant [15]. Although frailty might be reversible after transplant, its incidence rises later in the follow-up period after transplantation [16]. These results support our observation that every fourth elderly KTR was assessed as frail.

Among Fried frailty components, physical inactivity and exhaustion were most frequently observed in our cohort. The group of McAdams-DeMarco described poor grip strength and low physical activity as the most frequent frailty components in KTR at time of transplant, exhaustion was present in 25% of patients [15]. Since the majority of our patients

described deconditioning and exhaustion during the pandemic lockdown, we hypothesize that prolonged social isolation due to the COVID-19 pandemic might have a negative impact on physical activity in this vulnerable population [17].

In our study, low physical activity showed the best correlation with humoral response among all the Fried frailty components. This observation is in line with previous reports that studied humoral responses to the flu vaccination and suggested better humoral responses among more physically active older adults [18] and among healthy adults that exercised prior to vaccination [19].

The seroconversion rate in our KTR cohort was only 33% as opposed to the 45.8% observed in the whole cohort in the primary study [5]. While age had a significant impact on seroconversion in the primary study (adults 18+), we have not found any link between age and seroconversion rates in SARS-CoV-2 naïve KTR older than 70 years of age. The impact of age on vaccination response is poorly understood; however, lower antibody production and T-cell response after the first dose of BNT162b2 vaccine in 80+ years old individuals was previously reported [20]. While number of studies indicated that seroconversion rate in older KTR after SARS-CoV-2 vaccination was impaired, our study suggests that the impact of age is no longer relevant among KTR older than 70 years [2, 4, 5].

Similarly to previous studies, we identified an association between MMF therapy and an impaired humoral response to vaccination in frail KTR [21]. Therefore, when analyzing frailty effects on seroconversion, the adjustment for immunosuppression was necessary. Interestingly, all four KTR, who were not frail and did not receive MMF, mounted antibodies after SARS-CoV-2 mRNA vaccination. Conversely, seroconversion rate of just 17% was observed in frail KTR treated with MMF. The effect of frailty on the response to flu vaccination was studied in the general population with inconclusive results [11, 22], and data regarding the response to SARS-CoV-2 vaccines in frail subjects are scarce. Ríos et al. [12] showed no effect of frailty on post-vaccination antibody levels among nursing homes residents. However, a major limitation of said study is that majority of the subjects had previously experienced COVID-19 infection and were not virus naïve, which, in turn, biased the observation regarding vaccine-induced antibody production. To the best of our knowledge, our study is the first to assess the effect of frailty on mRNA vaccination response in solid organ recipients.

Based on the findings of our study, we suggest that geriatric assessment might be a useful tool to identify the most vulnerable KTRs at risk of insufficient vaccine response. These patients might, therefore, benefit from interventions such as application of additional vaccine booster doses or passive immunization.

The limitation of our study is the lack of validation cohort and the lack of data concerning the cellular response, as the measurement was not performed.

In conclusion, our study shows a significantly impaired humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in frail elderly KTR who were naïve to SARS-CoV-2.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11255-023-03557-6>.

Acknowledgements The authors would like to thank Marie Kolarova for administrative help, Olga Kaucka for the collection of the biological material, and Hedvika Cacarova for proofreading.

Author contributions MS, HV, and SRB performed the frailty assessment; PH and JG performed statistical analyses; MF and IS antibody detection; MM and IZ clinical data collection; MS, HV, SRB, IZ, and OV wrote the manuscript. All authors reviewed and edited the final manuscript. MS, HV, and SRB contributed equally to this work.

Funding Open access publishing supported by the National Technical Library in Prague. This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant no. NV19-06-00031, NU22-C-126 and NU21-06-00021, and by the Charles University research program Cooperation 34-Internal disciplines and by conceptual development of research organizations (Institute for Clinical and Experimental Medicine- IKEM, IN 00023001).

Data availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declarations

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval The local ethical board approved this study under No. G-21-07. Written informed consent was obtained from all participants.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Hilbrands LB, Duivenvoorden R, Vart P et al (2020) COVID-19-related mortality in kidney transplant and dialysis patients: results of the ERACODA collaboration. *Nephrol Dial Transplant* 35(11):1973–1983. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa261>
- Marion O, Del Bello A, Abravanel F et al (2021) Predictive factors for humoral response after 2-dose SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant patients. *Transplant Direct*. 8(1):e1248. <https://doi.org/10.1097/txd.0000000000001248>

3. Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D et al (2021) Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant* 21(8):2719–2726. <https://doi.org/10.1111/ajt.16615>
4. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N et al (2021) Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int* 99(6):1498–1500. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.04.005>
5. Magicova M, Zahrádka I, Fialova M et al (2022) Determinants of immune response to anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccines in kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Transplantation*. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004044>
6. Hariharan S, Israni AK, Danovitch G (2021) Long-term survival after kidney transplantation. *N Engl J Med* 385(8):729–743. <https://doi.org/10.1056/nejma2014530>
7. Demaret J, Corroyer-Simovic B, Alidjinou EK et al (2021) Impaired functional T-cell response to SARS-CoV-2 after two doses of BNT162b2 mRNA vaccine in older people. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.778679>
8. Fried LP, Tangen CM, Walston J et al (2001) Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>
9. Yao X, Hamilton RG, Weng N et al (2011) Frailty is associated with impairment of vaccine-induced antibody response and increase in post-vaccination influenza infection in community-dwelling older adults. *Vaccine* 29(31):5015–5021. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.077>
10. Moehling KK, Nowalk MP, Lin CJ et al (2018) The effect of frailty on HAI response to influenza vaccine among community-dwelling adults ≥ 50 years of age. *Hum Vaccines Immunother* 14(2):361–367. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1405883>
11. Loeb N, Andrew MK, Loeb M et al (2020) Frailty is associated with increased hemagglutination-inhibition titers in a 4-year randomized trial comparing standard- And high-dose influenza vaccination. *Open Forum Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA148>
12. Salmerón Ríos S, Mas Romero M, Cortés Zamora EB et al (2021) Immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in frail or disabled nursing home residents: COVID-A study. *J Am Geriatr Soc* 69(6):1441–1447. <https://doi.org/10.1111/jgs.17153>
13. Magicova M, Fialova M, Zahrádka I et al (2021) Humoral response to SARS-CoV-2 is well preserved and symptom dependent in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 21(12):3926–3935. <https://doi.org/10.1111/ajt.16746>
14. McAdams-DeMarco MA, Law A, Salter ML et al (2013) Frailty and early hospital readmission after kidney transplantation. *Am J Transplant* 13(8):2091–2095. <https://doi.org/10.1111/ajt.12300>
15. McAdams-DeMarco MA, Ying H, Olorundare I et al (2017) Individual frailty components and mortality in kidney transplant recipients. *Transplantation* 101(9):2126–2132. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001546>
16. Chu NM, Ruck J, Chen X et al (2022) Long-term trajectories of frailty and its components after kidney transplantation. *J Gerontol Ser A*. <https://doi.org/10.1093/gerona/glac051>
17. Dor-Haim H, Katzburg S, Revach P, Levine H, Barak S (2021) The impact of COVID-19 lockdown on physical activity and weight gain among active adult population in Israel: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11523-z>
18. Schuler PB, Leblanc PA, Marzilli TS (2003) Effect of physical activity on the production of specific antibody in response to the 1998–99 influenza virus vaccine in older adults. *J Sports Med Phys Fitness* 43(3):404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625524>.
19. Edwards KM, Burns VE, Allen LM et al (2007) Eccentric exercise as an adjuvant to influenza vaccination in humans. *Brain Behav Immun* 21(2):209–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.04.158>
20. Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P et al (2021) Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* 596(7872):417–422. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03739-1>
21. McAdams-DeMarco MA, Law A, Tan J et al (2015) Frailty, mycophenolate reduction, and graft loss in kidney transplant recipients. *Transplantation* 99(4):805–810. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000444>
22. Moehling KK, Zhai B, Schwarzmann WE et al (2020) The impact of physical frailty on the response to inactivated influenza vaccine in older adults. *Aging (Albany NY)* 12(24):24633–24650. <https://doi.org/10.18632/aging.202207>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6.4 Efektivita mRNA vakcín proti SARS-CoV-2 v prevenci infekce u pacientů po transplantaci ledviny

6.4.1 Úvod

Reálná účinnost mRNA vakcín proti SARS-CoV-2 v populaci pacientů po transplantaci ledviny je nejasná. Cílem této studie bylo stanovit asociaci mezi očkováním dvěma dávkami mRNA vakcíny a výskytem infekce SARS-CoV-2 u pacientů po transplantaci ledviny.

6.4.2 Metodika

Jednalo se o retrospektivní observační kohortovou studii probíhající od 17. 2. 2021 do 16. 5. 2021 v období třetí, respektive čtvrté a současně nejzávažnější vlny pandemie covidu-19. Do studie bylo zařazeno celkem 2 101 virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny sledovaných v transplantačním centru IKEM. Hlavním cílem studie bylo v populaci očkovaných a neočkovaných pacientů po transplantaci ledviny stanovit incidenci infekce virem SARS-CoV-2 verifikované PCR testem. Součástí studie byla také analýza průlomových infekcí a úmrtí asociovaných s covidem-19. Data pro primární analýzu týkající se vakcinačního statusu a potvrzených nálezů na základě PCR testů byla získána prostřednictvím Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS), kde byly tyto údaje povinně hlášeny. U každého pacienta, který byl nakažen během studijního období, byl zaznamenán klinický průběh covidu-19. Pro sběr klinických, transplantačních a demografických charakteristik jsme využili nemocniční hospitalizační systém.

Začátek sledovaného období každého účastníka studie začínal ve skupině neočkovaných jedinců. Do skupiny očkovaných pacientů se zařadil po kompletizaci vakcinace, tedy 2 týdny po druhé dávce mRNA vakcíny. Ve skupině neočkovaných jedinců zůstali i jedinci s neúplným očkováním a jejich sledování bylo ukončeno podáním první dávky vakcíny. Follow-up byl rovněž ukončen v případě nakažení virem SARS-CoV-2, dále pokud došlo k úmrtí nebo návratu do pravidelného dialyzačního léčení a dovršením studijního období. Výsledky jsou vyjádřeny pomocí incidence rate ratio (IRR). Incidence rate ratio je poměrem incidence rate v očkované a neočkované skupině pacientů. Incidence rate (IR) lze vypočítat vydělením počtu případů v dané skupině časem v riziku dané skupiny. Incidence rate ratio lze taktéž derivovat z Poissonského regresního modelu, kterým lze adjustovat na další proměnné (adjustované incidence rate ratio). Hlavní model byl adjustován na pohlaví, BMI, dobu od transplantace, udržovací imunosupresi, stupeň vzdělání, místo bydliště (venkov nebo město) a kalendářní čas.

6.4.3 Výsledky

Z celkem 2 101 pacientů po transplantaci ledviny zahrnutých do analýzy absolvovalo kompletní očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny 1 509 pacientů. Zcela nezačínaných na konci sledovaného období zůstalo 346 pacientů a neúplně očkovaných bylo 246 pacientů.

K nákaze virem SARS-CoV-2 došlo ve 33 případech ve skupině očkovaných pacientů a v 79 případech ve skupině neočkovaných pacientů po transplantaci ledviny (2,2 % vs. 22,3 %). Míra incidence (IR) ve skupině očkovaných byla 0,474 za 1 000 „person-days“ a 1,37 za 1 000 „person-days“ ve skupině neočkovaných. Neadjustovaný poměr míry incidence (IRR) byl 0,346 (95% CI 0,227–0,514), adjustovaný IRR 0,544 (95% CI 0,324–0,876). Očkování dvěma dávkami mRNA tedy vedlo k redukci rizika verifikované nákazy o 46 %.

Z celkem 33 nakažených osob v očkované skupině vyžadovalo hospitalizaci na jednotce intenzivní péče 5 pacientů (0,3 %), z toho jeden pacient s nutností mechanické ventilace. Ze 79 infikovaných osob ve skupině neočkovaných pacientů bylo celkem 16 (4,6 %) hospitalizováno na jednotce intenzivní péče, přičemž 4 z nich dospěli k nutnosti umělé plicní ventilace. K úmrtí z důvodu covidu-19 během studijního období došlo u 8 očkovaných a 11 neočkovaných pacientů (0,5 % vs. 3,2 %). Očkováni pacienti, kteří se infikovali a ti, kteří zemřeli v důsledku covidu-19, byli starší než neočkovaní pacienti (medián věku 71 vs. 50 let v případě infekcí; 72,5 vs. 61 let v případě úmrtí).

6.4.4 Diskuse

Očkování je jedním z nejdůležitějších opatření z hlediska prevence infekce a závažného průběhu onemocnění. Kompletní vakcinace proti SARS-CoV-2 snižuje riziko průlomové infekce nehledě na imunitní status pacienta, přesto jsou však imunosuprimované osoby včetně pacientů po orgánových transplantacích ve vyšším riziku infekce než imunokompetentní populace (Sun J. et al., 2022). Přestože na základě velikosti imunitní odpovědi po očkování lze nepřímo odhadnout míru protekce před infekcí, kterou vakcíny poskytují (Feng S. et al., 2021, Kemlin D. et al., 2023, Hovd M. et al., 2023), důležitá je zejména znalost reálné efektivity vakcín. Cílem této studie bylo stanovit asociaci mezi očkováním dvěma dávkami mRNA vakcíny a výskytem SARS-CoV-2 infekce u pacientů po transplantaci ledviny.

Naše studie ukázala, že očkování pacientů po transplantaci ledviny snižuje riziko nákazy o 46 %. Tato data navzdory prokázané oslabené imunitní odpovědi po očkování v populaci transplantovaných pacientů (Grupper A. et al., 2021, Sattler A. et al., 2021) svědčí o velkém přínosu vakcinace. Je však potřebné uvést, že efektivita vakcín v obecné populaci je

daleko vyšší (Polack F. P. et al., 2020). Navíc vzhledem k tomu, že mutace a vznik nových variant ovlivňuje účinnost vakcín (Abu-Raddad L. J. et al., 2021, Lopez Bernal J. et al., 2021, Wu N. et al., 2023), je nutné počítat s tím, že tyto výsledky platí jen pro konkrétní sledované období. Během studijního období dominovala v naší populaci varianta *Alpha*, proti které byla v obecné populaci pozorována vyšší efektivita vakcín než proti novějším variantám SARS-CoV-2. Účinnost dvou dávek mRNA vakcíny BNT162b2 z hlediska prevence SARS-CoV-2 infekce byla nižší v případě varianty *Beta* (89,5 % vs. 75 %) (Abu-Raddad L. J. et al., 2021) i varianty *Delta* (88 % vs. 93,7 %) (Lopez Bernal J. et al., 2023). Proti poslední dominantní variantě *Omicron* lze předpokládat ještě nižší efektivitu vakcín, podobně jak se ukázalo v obecné populaci (Andrews N. et al., 2022). Navíc míra ochrany, kterou vakcíny poskytují hlavně starším jedincům, v čase klesá, i když jejich efektivita může být obnovena aplikací posilovacích dávek (Menni C. et al., 2022).

Množství dat týkajících se účinnosti mRNA nebo vektorových vakcín je u pacientů po transplantaci solidních orgánů limitované a jejich výsledky jsou nekonzistentní. Zatímco první studie prokázala 81% snížení rizika symptomatické SARS-CoV-2 infekce (Aslam S. et al., 2021), ve druhé studii nebyla prokázána asociace mezi očkováním a redukcí rizika nákazy. Očkování však bylo spojeno s 20% snížením rizika úmrtí (Callaghan C. J. et al., 2022). Jak již bylo uvedeno, tento rozdíl může být vysvětlen dominancí jiné varianty ve sledovaném období těchto prací.

Naše analýza průlomových infekcí SARS-CoV-2 ukázala vyšší výskyt závažného průběhu onemocnění ve skupině neočkovaných jedinců. Podobně byl v této skupině pozorován vyšší výskyt úmrtí asociovaných s covidem-19. Pacienti, u kterých došlo navzdory očkování k nákaze nebo úmrtí, byli starší než neočkovaní jedinci. Nicméně vzhledem k malému počtu případů nelze na základě těchto výsledků vyvodit další závěry.

Limitací studie je retrospektivní observační design. Avšak randomizované kontrolované studie v rámci očkování proti tak závažnému onemocnění, jakým covid-19 zvláště pro transplantovanou populaci nepochybně je, by nebyly etické. Další limitací studie je nerovnoměrný follow-up studovaných kohort plynoucí jednak z různých sledovaných období očkových a neočkovaných osob a také z přirozeného vývoje epidemiologické situace, kdy se v čase mění výskyt a tudíž i riziko nákazy. Tento problém však do velké míry koriguje použitá statistická metoda. V neposlední řadě mohou být výsledky také ovlivněny různým chováním jedinců, kteří se rozhodli pro očkování, nebo naopak očkování být nechťeli.

Silnou stránkou této studie je spolehlivost dat týkajících se vakcinačního statusu a prokázaných infekcí využitím Národního zdravotního registru, kde byly tyto informace povinně hlášeny. Taktéž vysoká incidence nových případů infekce během nejzávažnější vlny pandemie covidu-19 spolu s vysokou mírou vakcinace pacientů umožnila cennou analýzu efektivity vakcín v reálných podmínkách během poměrně krátkého období.

Závěr

Očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 je asociováno s redukcí výskytu infekce. Přesto zůstávají tito pacienti ve vysokém riziku nákazy a všechna protiepidemická opatření včetně aplikace posilovacích dávek by měla být základní součástí prevence covidu-19 v této populaci.

Článek byl publikován v časopise *Annals of Internal Medicine*.

Association Between SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines and Lower Infection Rates in Kidney Transplant Recipients: A Registry-Based Report. *Ann Intern Med.* 2022 Jul;175(7): 961-968.

Kompletní článek je přiložen v anglickém jazyce.

Association Between SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines and Lower Infection Rates in Kidney Transplant Recipients

A Registry-Based Report

Ivan Zahradka, MD*; Vojtech Petr, MD*; Istvan Modos, MSc, PhD; Maria Magicova, MD; Ladislav Dusek, PhD; and Ondrej Viklicky, MD, PhD

Background: The real-world protection provided by SARS-CoV-2 messenger RNA (mRNA) vaccines to kidney transplant recipients (KTRs) remains uncertain.

Objective: To study the association between mRNA vaccination and SARS-CoV-2 infection rate in KTRs.

Design: Retrospective observational cohort study.

Setting: The Czech Republic (17 February to 16 May 2021).

Patients: 2101 KTRs followed in the Department of Nephrology at the Institute for Clinical and Experimental Medicine.

Measurements: Positive result for SARS-CoV-2 on polymerase chain reaction test and vaccination status of KTRs.

Results: The incidence rate in the vaccinated group was 0.474 per 1000 person-days (33 cases in 69 672 days at risk). The incidence rate in the unvaccinated group was 1.370 per 1000 person-days (79 cases in 57 658 days at risk). The

unadjusted incidence rate ratio (IRR; incidence rate of vaccinated/incidence rate of unvaccinated) for KTRs was 0.346 (95% CI, 0.227 to 0.514). The multivariable adjusted IRR for KTRs was 0.544 (CI, 0.324 to 0.876).

Limitation: Retrospective observational design, uneven follow-up of patient groups, and different exposition to SARS-CoV-2 stemming from strong temporal trends and differences in clinical and probably behavioral characteristics.

Conclusion: Vaccination of KTRs is associated with lower risk for SARS-CoV-2 infection.

Primary Funding Source: The Ministry of Health of the Czech Republic.

Ann Intern Med. doi:10.7326/M21-2973

Annals.org

For author, article, and disclosure information, see end of text.

This article was published at Annals.org on 3 May 2022.

* Drs. Zahradka and Petr contributed equally to this work.

Kidney transplant recipients (KTRs) are considered particularly vulnerable to SARS-CoV-2 infection, as higher rates of inpatient mortality, far exceeding those seen in the general population, have been reported (1–4). The SARS-CoV-2 messenger RNA (mRNA) vaccines have shown high clinical efficacy in preventing COVID-19 in the immunocompetent population (5, 6). However, impaired humoral and cellular responses to mRNA vaccines have recently been reported in KTRs (7–9). The assumption of an impaired vaccine response in KTRs is further supported by the well-known fact of a decreased immune response to influenza or pneumococcal vaccines in the transplant population (10–12). However, data about the effectiveness of SARS-CoV-2 vaccines are conflicting (13–15), and to what extent the 2 doses of an mRNA vaccine protect KTRs from COVID-19 is unclear. Furthermore, a third booster dose of an mRNA SARS-CoV-2 vaccine has been recently tested and applied in many countries (16–18).

Because randomized controlled trials in immunocompromised populations may not be ethically feasible, registry data may provide information on the association between SARS-CoV-2 vaccines and clinical protection of KTRs. Thus, to evaluate the association between SARS-CoV-2 mRNA vaccines and infection rates in KTRs, we did a retrospective registry-based cohort study of 2101 KTRs followed at our center.

METHODS

Design Overview

This study is a single-center, retrospective, observational, registry-based cohort study enrolling 2101 KTRs between

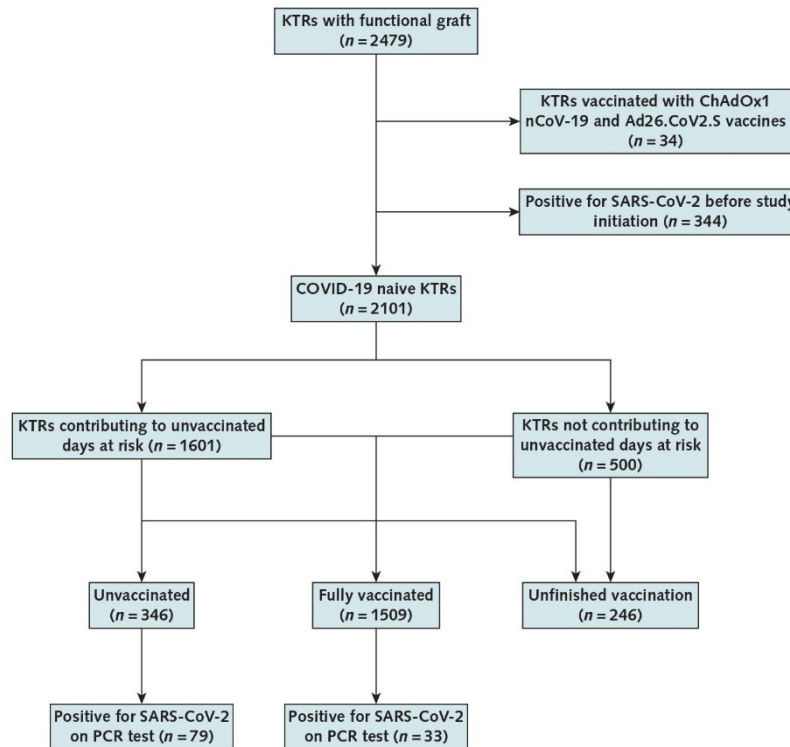
17 February and 16 May 2021. The aim of the study was to evaluate the association between 2-dose mRNA vaccination and incidence of SARS-CoV-2 infection among KTRs.

Outcomes and Follow-up

The primary outcome of the study was the incidence of SARS-CoV-2 infection, defined as a positive result for SARS-CoV-2 on a polymerase chain reaction (PCR) test, among fully vaccinated KTRs compared with unvaccinated KTRs. In addition, we analyzed COVID-19-related deaths and breakthrough infections.

The follow-up period started on 17 February and ended on 16 May 2021. The follow-up was ended on reaching the end point (PCR positivity), censoring (death or return to long-term dialysis), or on reaching the end of the study period. Study participants were divided into 2 subgroups depending on vaccination status (that is, vaccinated or unvaccinated) at the end of the follow-up.

The person-time for every participant was first counted toward the total person-days of the unvaccinated group, regardless of the latter vaccination. Those who survived without having a positive PCR test result until reaching full vaccination status (2 weeks after the second dose) were moved to the vaccinated subgroup, and their person-time started counting toward the total person-days of the vaccinated group. Therefore, vaccinated participants initiated their follow-up designated as unvaccinated, and their designation was later changed to vaccinated. This means that they contributed their follow-up time to both groups at

Figure 1. Flow chart of study participants.

Overall, 2479 KTRs with functional grafts were considered for inclusion to the study. To establish a SARS-CoV-2-naïve cohort, patients with previous positive results for SARS-CoV-2 infection were excluded, as were patients vaccinated with non-messenger RNA vaccines. In total, 2101 KTRs were considered as the SARS-CoV-2-naïve cohort. Of these, 1601 KTRs contributed to at least part of their follow-up time to the unvaccinated days at risk, whereas 500 did not contribute. These were the KTRs vaccinated between 13 January and 17 February, 6 of whom did not finish vaccination and thus did not contribute to any days at risk, and 494 of whom entered the study denoted as unfinished vaccination but afterward reached full vaccination status and, therefore, contributed only toward vaccinated days at risk. A total of 246 KTRs did not finish full vaccination because they had a positive result for SARS-CoV-2 infection after the first dose ($n = 28$), they did not receive the second dose for other reasons ($n = 5$), or they received the first dose before the end of the study period but reached full vaccination status after its end ($n = 213$). Kidney transplant recipients who did not finish full vaccination contributed to the unvaccinated days at risk and were censored at the day of first vaccine dose. A total of 1509 reached full vaccination and contributed toward vaccination days at risk; of these, 33 became positive for SARS-CoV-2 during the study period. A total of 346 were unvaccinated by the end of the study period, and 79 of them became positive for SARS-CoV-2 during the study period. KTR = kidney transplant recipient; PCR = polymerase chain reaction.

some point but never to both at the same time. The person-time between the administration of the first vaccine dose and reaching full vaccination status was eliminated and was therefore not counted toward total person-days of either category (vaccinated or unvaccinated).

To establish a SARS-CoV-2-naïve cohort, KTRs infected before the vaccination campaign were excluded. Waitlisted patients who received a transplant during the study period and those vaccinated by vector vaccines were also excluded. For more details, see Figure 1.

Vaccination of the eligible groups from the general population started on 1 January 2021, with critical infrastructure workers, health care workers, and elderly citizens first, in accordance with the government's strategic protocol (19). Vaccination of KTRs was initiated on 13 January 2021. Participants were considered fully vaccinated 2 weeks

after receiving the second dose of an mRNA vaccine, as was recommended (20). Thus, the beginning of the study period was chosen to be 17 February, which is the day when the first KTR (vaccinated on 13 January) reached full vaccination status. The end of the study period was chosen to be on 16 May for several reasons. First, most of the cohort was already vaccinated at that time and, thus, there were no events in the unvaccinated group from that time on (the last infection in an unvaccinated KTR was observed on 10 May). Second, the spring pandemic was dissipating at that point, with overall low rates of infection in the vaccinated KTRs. Finally, because we used a calendar time adjustment with 1-month intervals, making 16 May three months away from the beginning of the study.

All patients have signed an informed consent for administration of SARS-CoV-2 vaccination, independent of our

Table 1. Demographic Characteristics of the COVID-19-Naive KTRs

Characteristic	Vaccinated (n = 1509)	Unvaccinated (n = 346)	Standardized Mean Differences (95% CI)*
Mean age (SD), y	61.28 (11.78)	54.20 (14.26)	0.58 (0.46 to 0.7)
Male, n (%)	986 (65.34)	215 (62.14)	3.2 (−2.62 to 9.03)
Mean BMI (SD), kg/m ²	26.74 (4.38)	25.79 (4.53)	0.21 (0.1 to 0.33)
Retransplant, n (%)	168 (11.13)	47 (13.58)	−2.45 (−6.57 to 1.67)
Mean most recent estimated glomerular filtration rate (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (SD), mL/min/1.73 m ²	49.2 (21)	48.6 (20.4)	1.8 (−4.8 to 9)
Mean time from transplant (SD), y	8.45 (6.87)	8.53 (6.91)	−0.01 (−0.13 to 0.1)
Mean follow-up time (SD), d	46.17 (26.67)	72.81 (29.78)	−0.98 (−1.1 to −0.86)
Vaccination status against influenza in 2019, n (%)†	323 (47.71)	33 (24.63)	23.08 (14.43 to 31.74)
University/college degree, n (%)	192 (12.72)	31 (8.96)	3.76 (0.14 to 7.39)
Urban place of residence, n (%)	360 (23.86)	75 (21.68)	2.18 (−5.3 to 4.3)
Tacrolimus in maintenance immunosuppression, n (%)	1249 (82.77)	287 (82.95)	−0.18 (−4.75 to 4.4)
Cyclosporine A in maintenance immunosuppression, n (%)	152 (10.07)	31 (8.96)	1.11 (−2.44 to 4.66)
Prednisone in maintenance immunosuppression, n (%)	1336 (88.54)	301 (86.99)	1.55 (−2.53 to 5.61)
Mycophenolate in maintenance immunosuppression, n (%)	1228 (81.38)	275 (79.48)	1.9 (−2.97 to 6.76)
Mechanistic target of rapamycin inhibitor in maintenance immunosuppression, n (%)	115 (7.62)	20 (5.78)	1.84 (−1.14 to 4.82)
Belatacept in maintenance immunosuppression, n (%)	9 (0.6)	2 (0.58)	0.02 (−0.89 to 0.93)
SARS-CoV-2 vaccine, n (%)			
BNT162b2	1274 (84.43)	–	–
mRNA-1273	235 (15.57)	–	–

BMI = body mass index; KTR = kidney transplant recipient.

* Standardized mean differences are reported specifically as Cohen *d* with pooled SD for continuous variables and proportion differences for binary variables. There were 33 cases of SARS-CoV-2 infection detected among vaccinated KTRs and 79 cases among unvaccinated KTRs during the study period.

† Data missing for 832 (55.1%) and 212 (61.3%) patients in the vaccinated and unvaccinated groups, respectively.

study. Institutional review board approval is not required for anonymous retrospective observational studies under the current legislature in the Czech Republic.

Setting and Participants

All KTRs with functioning kidney allografts followed at our transplant center were considered for inclusion in the study. The Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM) is a high-volume transplant center (21) that primarily covers geographic regions of the country's capital Prague and the regions of Central, Southern, and Northern Bohemia, accounting for about 50% of the population of the Czech Republic. To illustrate, in 2019, IKEM performed 58% of the total number of kidney transplants in the country (299 kidney transplants out of 510).

The Czech Republic is a small country with 10.7 million inhabitants with a very homogeneous structure of population and habitation. There are no significant racial minorities—99.8% of Czech citizens are White. The population density is roughly the same around the country, with an average of 139 citizens per square kilometer.

National Registry for Infectious Diseases and Other Sources of Data

The National Registry for Infectious Diseases gathers all data about each PCR and antigen test done, each vaccine dose applied in the country, and all mandatory quarantines ordered by the Public Health authorities (22). These data are mandatorily reported in the registry from every laboratory and all health care providers in the country. Because of the comprehensive nature of a central registry with mandatory data reporting, the National Registry for Infectious Diseases registry allows for detailed

large-cohort analyses and was thus selected as the source of data for primary analysis (PCR tests and vaccination status). Vaccines were administered only by health care providers, and expenses were covered by the national health care system.

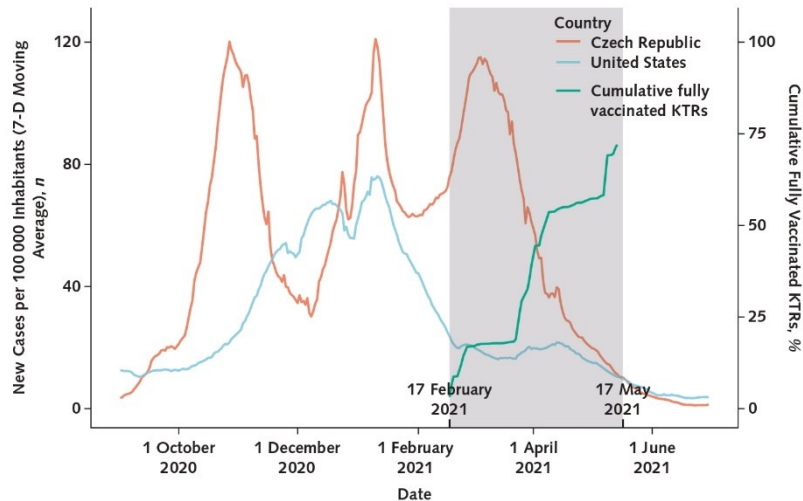
The clinical characteristics of the KTRs (age at the time of positive PCR test result, sex, body mass index (BMI), retransplantation status, most recent estimated glomerular filtration rate, years from transplant, vaccination status against influenza in 2019, university or college degree, urban or rural place of residence, and maintenance immunosuppression) (Table 1) were obtained from the hospital information system of IKEM. The clinical course of COVID-19 and the outcomes were recorded by a transplantation coordinator and a physician (M.M.) for each KTR with SARS-CoV-2 infection.

COVID-19 Setting and Baseline Risk for Infection

The Czech Republic was severely affected by the COVID-19 pandemic, and with 155 464 cases per million at the end of June 2021, it became the fourth most heavily affected country in the world at the time. In contrast, the cumulative incidence in the United States was 101 289 per million (Figure 2) and 44 531 in neighboring Germany at the same point in time.

The study period covers the entirety of the third and most severe wave of the pandemic (Figure 2). The highest number of confirmed infections was reported on 7 January 2021, with 17 773 positive PCR tests in a single day (0.17% of the whole Czech population). In the first week of January 2021, almost 1% of the population tested positive (90 684 new cases between 3 January and 9 January 2021) (23).

Therefore, when the study was initiated, the risk for infection was high, and a large proportion of events was

Figure 2. Seven-day moving average of new cases per 100 000 persons in the Czech Republic and the United States.

The shaded area denotes the study period. The red and blue lines denote new cases per 100 000 persons in the Czech Republic and the United States, respectively. The green line represents the cumulative proportion of fully vaccinated KTRs during the study period. KTR = kidney transplant recipient.

seen early on, and at the time, the proportion of vaccinated participants was low. Over time, the proportion of vaccinated participants was increasing, whereas the baseline risk for infection was decreasing. Thus, the final rate of SARS-CoV-2 infections in the unvaccinated cohort at the end of the study was unusually high. The study captures a public health crisis of a catastrophic scale and therefore provides unique data to evaluate SARS-CoV-2 mRNA vaccines in a real-world setting and with an extremely high risk for infection.

Testing for COVID-19 was covered by national health insurance; therefore, participants could be tested without hindrance. However, we acknowledge the KTR group may have had a slightly higher diagnostic rate. Our transplant center used an attentive system of KTR follow-up and support during the COVID-19 pandemic. Each KTR at our center has the means to directly contact their physician or transplant coordinator at any time. To boost early case detection, KTRs were repeatedly advised and educated to have a PCR test done if presenting any signs of COVID-19 illness. During the third wave of the pandemic, the government introduced mandatory regular testing for COVID-19 for employees, thereby increasing the detection rate in asymptomatic participants.

Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as mean (SD). Categorical variables are expressed as number (percentage) of participants within each group. The intergroup differences are reported as standardized mean differences (that is, Cohen *d* with pooled SD) for continuous variables and proportion differences for binary variables (both measures are reported along with their 95% CIs).

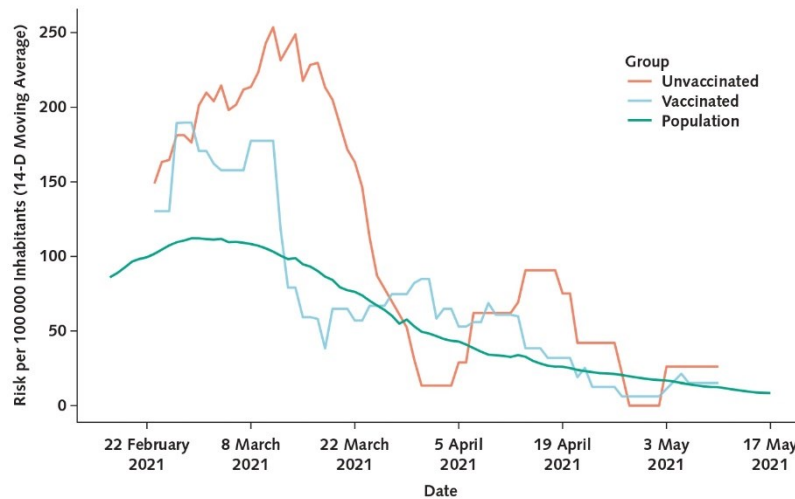
Incidence Rate Ratios and Poisson Regression Models

The unadjusted incidence rate ratio (IRR) is a ratio of the incidence rate in the vaccinated group and the unvaccinated group. The incidence rate is a ratio of the number of events and the days at risk for either the vaccinated or unvaccinated group.

Multivariable Poisson regression was used to derive the adjusted IRR. The models were adjusted for sex, BMI at the last check-up before study initiation, college or university degree, days from transplant, immunosuppression, and rural or urban place of residence. Because there are strong temporal trends in terms of the risk for infection (Figure 2) during the study follow-up, further adjustment was done. The model was adjusted to baseline risk by using a categorical covariate representing 1 of the 3 months of the study period in which the patient's follow-up started. No variable for which we adjusted the models had missing values.

The multivariable Poisson regression model was not adjusted to age because of multicollinearity between calendar time, vaccination status, and age. We computed the variance inflation factor for the covariates in the adjusted model, and we obtained 2.02 for vaccination, 1.68 for age, and 1.45 for calendar interval 2. We decided on variance inflation factor cutoff 2 for vaccination. We cannot remove vaccination and calendar interval covariates from the model (otherwise we would have no treatment effect or adjustment to background risk); therefore, we removed the age covariate to avoid multicollinearity. In the modified model, the variance inflation factor decreased to 1.49 for vaccination and 1.39 for interval 2. For a detailed description of the regression model, see the Appendix (available at [Annals.org](https://annals.org)).

Figure 3. Incidence of COVID-19 during the study period for the unvaccinated and vaccinated KTRs, along with the general population.



The incidence for each group is computed as the number of new cases divided by the number of persons at risk for that group. The values are smoothed using 14-d moving average. KTR = kidney transplant recipient.

Apart from the adjusted IRR, we also report marginally standardized incidence rates (24). To compute the marginally standardized incidence rate for the unvaccinated group, we predicted the response of each observation using the fitted model while assuming that each observation belongs to the unvaccinated group. Analogously, the marginally standardized incidence rate for the vaccinated group was computed by predicting the response of each observation using the fitted model while assuming that each observation belongs to the vaccinated group. Having predicted responses for each observation, we sum up these responses and divide them by the total follow-up time of all of the observations. The CIs for the marginally standardized incidence rates were computed using the bootstrap method (R package *boot* [R Foundation for Statistical Computing], type percentile, 2000 replicates). The statistical analysis was done in R, version 4.1.1 (R Foundation for Statistical Computing).

Role of the Funding Source

The funding source had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis or interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication.

RESULTS

Participants

A total of 2479 KTRs were considered for inclusion. After the exclusion of KTRs previously infected with SARS-CoV-2 and those vaccinated with vector-based vaccines (ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.CoV2.S), 2101 KTRs were included in the analysis. Of those, 1509 reached

full vaccination status, 346 were not fully vaccinated until the end of the study period, and 246 did not have complete vaccination (Figure 1 and Table 1). No patient was lost to follow-up, 11 patients during the follow-up period were censored (9 patients died from causes unrelated to COVID-19, and 2 patients had graft failure). The fully vaccinated and unvaccinated groups did not vary in basic characteristics, apart from age, length of follow-up in the study, and, interestingly, in the rate of vaccination against influenza in 2019.

The cumulative proportion of fully vaccinated KTRs during the study period is shown in Figure 2.

Incidence Rates and IRR in the KTR Cohort

Infection with SARS-CoV-2 was reported in 33 vaccinated and 79 unvaccinated KTRs. The incidence rate in the vaccinated group was 0.474 per 1000 person-days (33 cases in 69 672 days at risk), and the incidence rate in the unvaccinated group was 1.370 per 1000 person-days (79 cases in 57 658 days at risk). Thus, the unadjusted IRR was 0.346 (95% CI, 0.227 to 0.514). Incidence of COVID-19 during the study period for the unvaccinated and vaccinated KTRs, along with the general population, are shown in Figure 3.

Furthermore, the adjusted IRR was calculated (using a multivariable Poisson regression model) for KTR sex, BMI, days from transplant, maintenance immunosuppressive regimen, university or college degree, place of residence (rural or urban), and calendar time. The adjusted IRR was 0.544 (CI, 0.324 to 0.876). The marginally standardized incidence rate for the vaccinated group was 0.06 (CI, 0.037 to 0.085), whereas the rate for the unvaccinated

Table 2. Outcomes in Fully Vaccinated and Unvaccinated KTRs

Outcome	Vaccinated (n = 1509), n (%)	Unvaccinated (n = 346), n (%)
Infections during the study period	33 (2.2)	79 (22.3)
Intensive care unit admission	4 (0.3)	12 (3.5)
Mechanical ventilation	1 (0.07)	4 (1.2)
Death	8 (0.5)	11 (3.2)

KTR = kidney transplant recipient.

group was 0.11 (CI, 0.083 to 0.143). The detailed model is shown in **Appendix Table 1** (available at [Annals.org](#)).

Clinical Characteristics of the Infections in the KTR Cohorts

To explore possible effectiveness of vaccination against COVID-19 severity, we have analyzed clinical data from vaccinated and unvaccinated patients infected with SARS-CoV-2. The clinical outcomes are summarized in **Table 2**.

Eighteen KTRs died of COVID-19–related causes during the study period—10 unvaccinated and 8 vaccinated. Vaccinated KTRs who were infected (median age, 71 vs. 50 years) and who died (median age, 72.5 vs. 61 years) were older than unvaccinated KTRs. Granular description of these cases is given in **Appendix Table 2** (available at [Annals.org](#)).

DISCUSSION

Despite the rapid publication activity of COVID-19–related studies and reports, evidence lags behind the urgency for decision makers. Both the humoral and cellular immune responses had been reported to be substantially impaired in KTRs (7–9), and the current expert boards' recommendations about additional booster doses in solid organ transplant recipients are based mainly on these observations (17, 18). It is, however, the clinical vaccine effectiveness that matters to patients, society, and decision makers.

Our study points toward an association between 2 doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccines and a lower risk for COVID-19 illness in KTRs. Data of the general population obtained from the National Registry for Infectious Diseases registry, however, show that infection risk was one order of magnitude higher for KTRs than the general population (unadjusted IRR, 0.036 from January to June 2021; data not shown).

To date, only a handful of studies reporting the real-world effectiveness of SARS-CoV-2 vaccines in solid organ recipients with conflicting results were published. In a study by Aslam and colleagues (15), clinical effectiveness with almost 80% reduction in the incidence of symptomatic COVID-19 among vaccinated solid organ recipients was seen in a U.S. cohort between 1 January and 2 June 2021. Kidney transplant recipients represented 44.5% of the cohort, and almost 70% were vaccinated with mRNA vaccines. On the other hand, a recent study by Callaghan and colleagues (14) showed no effectiveness against SARS-CoV-2 infection in a British cohort from 1 June to 31 August 2021, although SARS-CoV-2 vaccination was associated with reduced COVID-19–related death. The conflicting outcomes

could be at least partly attributed to the differences between the studies—for example, during Callaghan and colleagues' study, the Delta variant was the dominant virus variant as opposed to the Alpha variant being the dominant variant during Aslam and colleagues' study and our study. Because SARS-CoV-2 vaccination is less effective against the Delta variant than it is against the Alpha variant in the general population (25), one may speculate that perhaps 2-dose vaccination in solid organ recipients reached its limits with this virus variant. Another study by Qin and colleagues (13) showed that the risk for breakthrough infections is higher in solid organ recipients than in the general population, but a missing comparison to unvaccinated persons limits the interpretation of vaccine effectiveness. These findings are in line with the findings from our study.

The estimates of real-world vaccine effectiveness in the general population had also been reported. For instance, Angel and colleagues (26) reported unadjusted IRR (0.03 [CI, 0.01 to 0.06]) in health care workers. However, this report, like many others, uses methods that may at times misrepresent vaccine effectiveness. The problem stems from the days-at-risk calculation method when the vaccinated group is followed up only from the moment of reaching full vaccination status, whereas the unvaccinated group's follow-up starts from an arbitrarily decided point in time. This produces a 2-fold problem. First, the follow-up time of the vaccinated participants is then inherently shorter, and second, because of the strong temporal trends in COVID-19 outbreaks, the risk for infection may vary during the study period. Therefore, even though the days at risk for 2 patient groups could be the same, the risk for being infected during that time could be substantially different, which was the case in our study. These issues have been addressed by several statistical approaches, such as calendar time adjustments in a multivariable Poisson regression model.

It should be emphasized that this report was possible only because of several factors. First, the extremely high viral load in the population and resulting incidence of new cases during the second and third waves in the first half of 2021, combined with a relatively fast SARS-CoV-2 vaccine rollout in the KTR population, resulting in a unique combination of many events in both vaccinated and unvaccinated control participants during a relatively narrow time frame of the study. Second, the National Registry for Infectious Diseases provided a reliable, nationwide source of data on the KTR population followed at IKEM.

The strengths of this study are the use of reliable data from the central nationwide registry (22), the large cohort in a high-volume transplant center, and the high rates of COVID-19 cases due to the severe wave of COVID-19 in the spring of 2021.

The limitations of this study are the retrospective observational design and uneven follow-up. The observational design is especially limiting because of the strong temporal trends in terms of the changing risk for baseline infection, and no statistical adjustment can fully substitute a well-designed randomized controlled trial in this scenario. However, because KTRs are at such high risk for a serious course of the disease, it may not be ethically feasible to deny them any kind of protection. Observational

data may therefore be the only alternative to estimate the vaccination effectiveness. The uneven follow-up is largely corrected by the statistical method and follow-up time definition. Furthermore, different behavioral patterns that could be assumed in persons who decided either for or against vaccination may also be a source of bias.

It is important to note that the available data on disease severity in breakthrough infections and deaths must be interpreted cautiously. The inherent differences between the groups, especially in terms of age, hinder direct comparison, and the low number of observed events precludes multivariable modeling and further adjustments.

It is also necessary to stress that these data are pertinent only for the study period, which was done during a time when the Alpha variant was predominant. The change of the baseline setting, mainly due to the emerging variants of concern, can lead to further attenuation of the real-world effectiveness (27).

In conclusion, the association between 2 doses of mRNA SARS-CoV-2 vaccines and lowered risk for infection shown in our study provides much needed real-world evidence. However, despite the effectiveness in KTRs, there were still breakthrough infections, and indirect comparisons suggest lower effectiveness compared with the general population. Thus, we believe that the current recommendations for additional booster doses based on laboratory immune-monitoring studies are also supported by our clinical report. Kidney transplant recipients should continue to be prioritized for booster doses in vaccination programs.

From Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic (I.Z., V.P., M.M., O.V.); Information Technology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic (I.M.); and Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic, Prague, Czech Republic (L.D.).

Acknowledgment: The authors thank Mrs. Adela Sucha for invaluable help with clinical data reporting and Petr Raska, MSc, and Michal Hojny PharmD, for organization of the vaccination campaign at IKEM.

Financial Support: The IKEM is supported by the Ministry of Health of the Czech Republic by its conceptual development of research organizations grant (IKEM, IN 00023001) and NU22-C-126.

Disclosures: Disclosures can be viewed at www.acponline.org/authors/icmje/ConflictOfInterestForms.do?msNum=M21-2973.

Reproducible Research Statement: *Study protocol, statistical code, and data set:* Available from Dr. Viklicky on reasonable request (e-mail, ondrej.viklicky@ikem.cz).

Corresponding Author: Ondrej Viklicky, MD, PhD, Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21, Prague, Czech Republic; e-mail, ondrej.viklicky@ikem.cz.

Author contributions are available at Annals.org.

Annals.org

References

- Phanish M, Ster IC, Ghazanfar A, et al. Systematic review and meta-analysis of COVID-19 and kidney transplant recipients, the South West London Kidney Transplant Network experience. *Kidney Int Rep.* 2021;6:574-585. [PMID: 33363263] doi:10.1016/j.ekir.2020.12.013
- Jager KJ, Kramer A, Chesnaye NC, et al. Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe. *Kidney Int.* 2020;98:1540-1548. [PMID: 32979369] doi:10.1016/j.kint.2020.09.006
- Hilbrands LB, Duivenvoorden R, Vart P, et al; ERACODA Collaborators. COVID-19-related mortality in kidney transplant and dialysis patients: results of the ERACODA collaboration. *Nephrol Dial Transplant.* 2020;35:1973-1983. [PMID: 33151337] doi:10.1093/ndt/gfaa261
- Caillard S, Anglicheau D, Matignon M, et al; French SOT COVID Registry. An initial report from the French SOT COVID Registry suggests high mortality due to COVID-19 in recipients of kidney transplants. *Kidney Int.* 2020;98:1549-1558. [PMID: 32853631] doi:10.1016/j.kint.2020.08.005
- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al; COVE Study Group. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384:403-416. [PMID: 33378609] doi:10.1056/NEJMoa2035389
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383:2603-2615. [PMID: 33301246] doi:10.1056/NEJMoa2034577
- Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D, et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant.* 2021;21:2719-2726. [PMID: 33866672] doi:10.1111/ajt.16615
- Marion O, Del Bello A, Abravanel F, et al. Safety and immunogenicity of anti-SARS-CoV-2 messenger RNA vaccines in recipients of solid organ transplants [Letter]. *Ann Intern Med.* 2021;174:1336-1338. [PMID: 34029487] doi:10.7326/M21-1341
- Bertrand D, Hamzaoui M, Lemée V, et al. Antibody and T cell response to SARS-CoV-2 messenger RNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32:2147-2152. [PMID: 34112706] doi:10.1681/ASN.2021040480
- Smith KG, Isbel NM, Catton MG, et al. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:160-4. [PMID: 9481733]
- Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Naranjo P, et al. Influenza virus immunization effectivity in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation.* 2000;69:436-9. [PMID: 10706057]
- Dendle C, Stuart RL, Polkinghorne KR, et al. Seroresponses and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccination in kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2018;20:e12866. [PMID: 29512234] doi:10.1111/tid.12866
- Qin CX, Moore LW, Anjan S, et al. Risk of breakthrough SARS-CoV-2 infections in adult transplant recipients [Letter]. *Transplantation.* 2021;105:e265-e266. [PMID: 34310531] doi:10.1097/TP.0000000000003907
- Callaghan CJ, Mumford L, Curtis RMK, et al; NHSBT Organ and Tissue Donation and Transplantation Clinical Team. Real-world effectiveness of the Pfizer-BioNTech BNT162b2 and Oxford-AstraZeneca ChAdOx1-S vaccines against SARS-CoV-2 in solid organ and islet transplant recipients. *Transplantation.* 2022;106:436-446. [PMID: 34982758] doi:10.1097/TP.0000000000004059
- Aslam S, Adler E, Mekeel K, et al. Clinical effectiveness of COVID-19 vaccination in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2021;23:e13705. [PMID: 34324256] doi:10.1111/tid.13705
- Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA.* 2021. [PMID: 34297036] doi:10.1001/jama.2021.12339

Annals of Internal Medicine

7

17. Villanego F, Cazorla JM, Vígara LA, et al. Protecting kidney transplant recipients against SARS-CoV-2 infection: a third dose of vaccine is necessary now [Letter]. *Am J Transplant*. 2022;22:1275-1276. [PMID: 34467623] doi:10.1111/ajt.16829
18. Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients [Letter]. *N Engl J Med*. 2021;385:661-662. [PMID: 34161700] doi:10.1056/NEJMc2108861
19. Ministry of Health of the Czech Republic. Strategie očkování proti COVID-19 v České Republice. Accessed at www.mzcr.cz/wp-content/uploads/2021/01/Strategie_ockovani_proti_covid-19_aktual_22122020.pdf on 9 October 2021.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Stay up to date with your COVID-19 vaccines. Accessed at www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/fully-vaccinated.html on 3 October 2021.
21. Viklický O, Fronek J, Trunecka P, et al. Organ transplantation in the Czech Republic [Editorial]. *Transplantation*. 2017;101:2259-2261. [PMID: 28926517] doi:10.1097/TP.0000000000001871
22. Komenda M, Bulhart V, Karolyi M, et al. Complex reporting of the COVID-19 epidemic in the Czech Republic: use of an interactive web-based app in practice. *J Med Internet Res*. 2020;22:e19367. [PMID: 32412422] doi:10.2196/19367
23. Johns Hopkins University & Medicine. COVID-19 dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Accessed at <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> on 3 October 2021.
24. Muller CJ, MacLehose RF. Estimating predicted probabilities from logistic regression: different methods correspond to different target populations. *Int J Epidemiol*. 2014;43:962-70. [PMID: 24603316] doi:10.1093/ije/dyu029
25. Bruxvoort KJ, Sy LS, Qian L, et al. Effectiveness of mRNA-1273 against Delta, Mu, and other emerging variants of SARS-CoV-2: test negative case-control study. *BMJ*. 2021;375:e068848. [PMID: 34911691] doi:10.1136/bmj-2021-068848
26. Angel Y, Spitzer A, Henig O, et al. Association between vaccination with BNT162b2 and incidence of symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infections among health care workers. *JAMA*. 2021;325:2457-2465. [PMID: 33956048] doi:10.1001/jama.2021.7152
27. Caniels TG, Bontjer I, van der Straten K, et al; Amsterdam UMC COVID-19 S3/HCW study group. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern evade humoral immune responses from infection and vaccination. *Sci Adv*. 2021;7:eabj5365. [PMID: 34516917] doi:10.1126/sciadv.abj5365

Author Contributions: Conception and design: I. Modos, V. Petr, O. Viklicky, I. Zahradka.
 Analysis and interpretation of the data: L. Dusek, M. Magicova, I. Modos, V. Petr, O. Viklicky, I. Zahradka.
 Drafting of the article: M. Magicova, V. Petr, O. Viklicky, I. Zahradka.
 Critical revision of the article for important intellectual content: M. Magicova, V. Petr, O. Viklicky, I. Zahradka.
 Final approval of the article: L. Dusek, M. Magicova, I. Modos, V. Petr, O. Viklicky, I. Zahradka.
 Statistical expertise: L. Dusek, I. Modos.
 Obtaining of funding: O. Viklicky.
 Collection and assembly of data: M. Magicova, I. Modos, V. Petr, I. Zahradka.

APPENDIX: STATISTICAL APPENDIX—DETAILED DESCRIPTION OF THE POISSON MULTIVARIABLE REGRESSION MODEL

The Poisson regression was fitted using the following covariates:

vaccination status (binary, 1 = vaccinated),
 sex (binary, 1 = man),

university/college degree (binary, 1 = yes),
 urban place of residence (binary, 1 = yes),
 BMI (continuous),
 time from kidney transplantation (continuous, in years),
 immunosuppression Tacrolimus, Cyclosporine A, Prednisone, Mycophenolate, mTOR inhibitor, Belatacept (all binary variables, 1 = yes),
 and month (categorical, see below for details).

The offset is a logarithm of the follow-up days and the response variable is binary with 1 representing that the event occurred. The data are provided at individual level.

The model was adjusted to baseline risk by using a categorical covariate month representing the time interval, in which the patient's follow-up started. The time intervals are: 17 February to 16 March 2021 (reference interval), 17 March to 16 April 2021, and 17 April to 16 May 2021. Please note that vaccinated patients that contribute both to vaccinated and unvaccinated days at risk are represented twice in the data with different value of month covariate.

The fitting was done in R language using glm function and family = "poisson."

Appendix Table 1. Adjusted IRR With Poisson Regression Modeling*

Covariate	Adjusted IRR (95% CI)
Vaccinated	0.544 (0.324-0.876)
Male	0.831 (0.569-1.225)
University/college degrees	1.216 (0.625-2.162)
Urban place of residence	0.887 (0.538-1.402)
BMI	0.996 (0.95-1.039)
Years from kidney transplant	0.98 (0.945-1.014)
Tacrolimus in maintenance immunosuppression	1.889 (0.593-8.604)
Cyclosporine A in maintenance immunosuppression	2.444 (0.682-11.77)
Prednisone in maintenance immunosuppression	1.541 (0.747-3.610)
Mycophenolate in maintenance immunosuppression	1.1 (0.644-1.997)
Mechanistic target of rapamycin inhibitor in maintenance immunosuppression	0.75 (0.204-2.127)
Belatacept in maintenance immunosuppression	3.473 (0.162-30.82)
Calendar time adjustment	
17 February-16 March	Reference
17 March-16 April	0.409 (0.189-0.834)
17 April-17 May	0.385 (0.021-1.845)

BMI = body mass index; IRR = incidence rate ratio; KTR = kidney transplant recipient.

* There were 33 cases of SARS-CoV-2 infection detected among vaccinated KTRs and 79 cases among unvaccinated KTRs during the study period.

Appendix Table 2. COVID-19-Related Deaths in KTRs

Case Number	Vaccination Status	Sex	Age, y	Time From Transplant, mo	BMI, kg/m ²	Diabetes Mellitus	Retransplant	Human Leukocyte Antigen Mismatch, %	Maximum Pretransplant Panel-Reactive Antibodies, n	eGFR, mL/min/1.73 m ²	Maintenance Immunosuppression	Induction	Rejection Treatment in the Past Year	Cause of Death
1	Vaccinated	Male	70	202	26.2	No	No	4	4	93.6	CyA + MMF + CS	None	No	COVID-19-related pneumonia + generalized cancer
2	Vaccinated	Female	78	182	20.2	No	No	3	0	22.2	CyA + MMF	None	No	COVID-19-related pneumonia
3	Vaccinated	Male	82	143	25.8	No	No	3	0	56.4	CyA + CS	None	No	COVID-19-related pneumonia + terminal dementia
4	Vaccinated	Female	71	96	30.3	Yes	No	2	2	10.8	TAC + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
5	Vaccinated	Male	71	87	27.3	Yes	No	3	16	20.4	CyA + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
6	Vaccinated	Male	74	43	26	Yes	No	2	48	27.6	TAC + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia + bilateral heart failure
7	Vaccinated	Male	70	49	32.5	No	No	3	2	46.2	TAC + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19-related pneumonia
8	Vaccinated	Female	74	23	30.1	Yes	No	5	56	51.6	TAC + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19-related pneumonia
9	Unvaccinated	Male	54	4	17.6	No	No	4	6	33	CyA + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19-related pneumonia
10	Unvaccinated	Female	54	128	41	Yes	No	3	78	31.8	TAC + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
11	Unvaccinated	Male	62	123	21.7	Yes	No	5	0	10.8	TAC + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19-related pneumonia
12	Unvaccinated	Male	72	89	35.8	Yes	No	2	4	22.2	CyA + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19 illness + terminal dementia
13	Unvaccinated	Male	69	98	33.2	Yes	No	1	0	27.6	TAC + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
14	Unvaccinated	Male	69	74	29.7	No	No	2	0	31.8	TAC + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
15	Unvaccinated	Male	60	39	45.4	No	No	5	6	18.6	TAC + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia + bilateral heart failure
16	Unvaccinated	Male	48	39	30.9	Yes	No	1	4	39	TAC + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia
17	Unvaccinated	Male	46	45	35.1	No	No	3	0	66	TAC + MMF + CS	Basiliximab	No	COVID-19-related pneumonia
18	Unvaccinated	Male	70	37	23.7	No	No	3	0	37.2	TAC + MMF + CS	T-cell depletive	No	COVID-19-related pneumonia

BMI = body mass index; CyA = cyclosporine A; CS = corticosteroids; eGFR = estimated glomerular filtration rate with Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation; KTR = kidney transplant recipient; MMF = mycophenolate mofetil or mycophenolic acid; TAC = tacrolimus.

7. Diskuse

Výsledky původních vědeckých prací jsou podrobně diskutovány v rámci samostatných kapitol, zde uvádím souhrn zásadních dosažených výsledků.

První část této práce byla zaměřena na analýzu humorální imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny po přirozené infekci virem SARS-CoV-2, neboť druhá vlna pandemie covidu-19 s sebou přinesla několikanásobný nárůst potvrzených případů nákazy v době, kdy nebylo k dispozici očkování. V rámci této analýzy jsme u pacientů měřili IgG protilátky proti spike proteinu viru SARS-CoV-2. Spike protein, respektive receptorová vazebná doména (RBD), je vysoce imunogenní oblast (Piccoli L. et al., 2020) a použití metod detekujících tyto protilátky se právě v této populaci jeví jako nejvhodnější (Prendecki M. et al., 2020). Zjistili jsme, že humorální odpověď pacientů po transplantaci ledviny na infekci SARS-CoV-2 je navzdory imunosupresivní terapii zachovaná a srovnatelná s obecnou populací. Naše data tedy nepotvrdila předpoklad snížené imunitní odpovědi pacientů po transplantaci ledviny po infekci virem SARS-CoV-2. Míra sérokonverze po symptomatické infekci verifikované PCR testem byla 82,6 % u pacientů po transplantaci ledviny a 95,2 % v imunokompetentní populaci zdravotníků. Hladiny protilátek indukovaných infekcí SARS-CoV-2 byly významně vyšší u pacientů se závažným průběhem onemocnění ve srovnání s jedinci s mírným nebo asymptomatickým průběhem. Analýzou faktorů ovlivňujících humorální odpověď po infekci jsme identifikovali pouze symptomatický průběh a přítomnost středně závažných až závažných symptomů, tedy symptomů vykazujících kolinearitu se symptomy z postižení dolních dýchacích cest, jako jediné signifikantní. Dosud byla závislost hladin protilátek na závažnosti průběhu covidu-19 popsána pouze v netransplantované populaci.

Další část práce byla v souvislosti se zahájením očkování proti SARS-CoV-2 zaměřena na analýzu postvakcinační imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Našimi cíli byla analýza protilátkové a buněčné odpovědi po dvou dávkách mRNA vakcíny, identifikace faktorů ovlivňujících postvakcinační imunitní odpověď a stanovení funkce štěpu po očkování. Podobně jako v první studii i v tomto případě jsme u pacientů měřili IgG protilátky proti spike proteinu využitím identické metody (CLIA). Buněčná odpověď byla měřena využitím metody založené na principu detekce interferonu gamma uvolněného SARS-CoV-2 specifickými T-lymfocyty (IGRA).

Potvrdili jsme předpoklad porušené humorální odpovědi u pacientů očkováných po transplantaci ledviny, kteří neprodělali covid-19. U těchto jedinců došlo k sérokonverzi pouze

ve 40 % případů. Identifikovali jsme však dvě skupiny pacientů, u kterých byla humorální odpověď po očkování zachována. Tou první byli pacienti s dříve prodělanou infekcí SARS-CoV-2 očkování po transplantaci, čímž došlo k vytvoření hybridní imunity. Druhou skupinou byli virus-naivní pacienti po transplantaci ledviny očkování ještě na čekací listině. Tato kohorta pacientů dosud ve studiích analyzována nebyla, podobně většina studií nezahrnovala ani pacienty s dříve verifikovanou infekcí SARS-CoV-2. V těchto skupinách jsme pozorovali nejen vysoké hladiny vakcinací indukovaných protilátek, ale také téměř sto procentní míru postvakcinační sérokonverze.

Vzhledem k tomu, že jsme ve studii neanalyzovali neutralizační aktivitu protilátek, nelze určit, do jaké míry byly námi detekované protilátky protektivní. Vycházíme-li ze skutečnosti, že titr anti-S1 specifických IgG protilátek vykazuje silnou korelaci s neutralizační aktivitou proti „variants of concern“, ačkoliv s nutností vyšších hladin anti-S1 IgG pro neutralizaci posledně dominující varianty *Omicron* (Kho M. et al., 2023), můžeme předpokládat alespoň částečnou ochranu. Velkou míru ochrany lze předpokládat u jedinců s hybridní imunitou. V této skupině byl medián hladiny naměřených protilátek 200násobně vyšší než optimální cut-off použité metody.

Jako další jsme identifikovali faktory ovlivňující humorální odpověď po očkování. Mužské pohlaví, delší doba od transplantace, lepší funkce štěpu před očkováním a prodělání infekce SARS-CoV-2 byly pozitivně asociovány s tvorbou postvakcinačních protilátek. Naopak negativními faktory humorální odpovědi po očkování byly vyšší věk, imunosupresivní terapie mykofenolát mofetilem a depleční léčba antithymocytárním globulinem nebo rituximabem v posledním roce před očkováním. Na základě těchto výsledků by se nabízela možnost perivakcinačních úprav imunosuprese, nicméně vzhledem k možnému riziku rejekce to nelze doporučit. Navíc vysazení mykofenolátu po dobu dvou týdnů v době očkování nemělo vliv na humorální odpověď po vakcinaci (Regele F. et al., 2022).

Buněčnou odpověď po očkování jsme analyzovali pouze v malé kohortě pacientů. Podobně jako v případě protilátkové odpovědi byla T-buněčná odpověď frekventnější u jedinců s anamnézou covidu-19. Předchozí infekce SARS-CoV-2 byla jediným signifikantním faktorem ovlivňujícím vývoj SARS-CoV-2 specifických T-lymfocytů.

Analýza případného ovlivnění funkce štěpu očkováním se týkala pouze pacientů očkováných po transplantaci. Během sledovaného období jsme nepozorovali rozdíl v glomerulární filtraci před a po vakcinaci.

Dalším cílem této práce byla analýza vlivu syndromu frailty neboli syndromu geriatrické křehkosti na humorální odpověď po dvou dávkách mRNA vakcíny. Tato studie se týkala kohorty virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny ve věku 70 let a více, jelikož vyšší věk je rizikovým faktorem mortality na covid-19 (Hovd M. et al., 2023, Williamson E. J. et al., 2020). Jako první jsme v transplantované populaci prokázali signifikantní asociaci mezi frail statusem a horší sérokonverzí po očkování. Míra sérokonverze v celé této kohortě pacientů byla 33 %, v případě frail pacientů pouze 23 %. To je o 7 %, respektive o 17 % méně oproti skupině pacientů z primární studie, která zahrnovala i mladší jedince. Z jednotlivých kritérií syndromu frailty byla v univariabilní analýze fyzická inaktivita jako jediná signifikantně spojena s horší postvakcinační sérokonverzí. Některé studie, z nichž většina cílila právě na ovlivnění fyzické aktivity, naznačují možnou reverzibilitu frailty syndromu (Kolle A. T. et al., 2023). V některých případech by tak zaměření se na možné ovlivnitelné kategorie tohoto syndromu mohlo potenciálně zlepšit postvakcinační imunitu. Nejdůležitějším opatřením by však měla být aplikace posilovacích dávek očkování. Minimálně v obecné populaci vyššího věku vedla tato strategie ke zlepšení jak humorální, tak buněčné imunity (Romero-Olmedo A. J. et al., 2022).

Jelikož v klinické praxi je důležitá reálná účinnost vakcín, v poslední části naší práce jsme zkoumali asociaci mezi očkováním a výskytem průlomové infekce SARS-CoV-2 u virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny. Zjistili jsme, že aplikace dvou dávek mRNA vakcíny vedla během sledovaného období v době dominující varianty *Alpha* k 46% redukcii rizika nákazy. Analýza průlomových SARS-CoV-2 infekcí naznačila vyšší výskyt závažného průběhu onemocnění a vyšší mortalitu na covid-19 ve skupině neočkovaných jedinců.

Navzdory očkování a jeho prokazatelné efektivitě v této populaci, i když nižší než v případě imunokompetentních jedinců (Polack F. P. et al., 2020), zůstává velká část pacientů po transplantaci ledviny ve vysokém riziku infekce. Jelikož aplikace posilovacích dávek vakcín zlepšuje imunitní odpověď alespoň u části pacientů, u kterých nedošlo k sérokonverzi ani po předešlých dávkách (Thomson T. et al., 2022, Kemlin D. et al., 2023, Arias-Cabrales C. et al., 2023, Hovd M. et al., 2023), a obnovuje účinnost vakcín klesající v čase (Menni C. et al., 2022), mělo by být toto preventivní opatření doporučováno všem pacientům po transplantaci ledviny.

8. Závěry

1. Testováním IgG protilátek proti spike proteinu jsme v populaci pacientů po transplantaci ledviny, kteří prodělali infekci virem SARS-CoV-2, prokázali významnou humorální odpověď srovnatelnou s obecnou populací. Ukázali jsme, že pacienti se závažnějším průběhem onemocnění covid-19 tvořili vyšší hladiny protilátek než pacienti s mírným průběhem nebo asymptomatickou nákazou. Závislost hladin protilátek na závažnosti symptomů byla do té doby popisována pouze v netransplantované populaci. Navíc přítomnost symptomů a středně závažné až závažné symptomy spojené s postižením dolních dýchacích cest byly jedinými faktory ovlivňujícími tvorbu protilátek po infekci. Tato data poukazují na zachovanou imunitní odpověď po infekci SARS-CoV-2 přes imunosupresivní stav.

2. Analýzou humorální imunity po očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 jsme v populaci pacientů po transplantaci ledviny prokázali vysokou imunogenicitu vakcín u pacientů s dříve prodělanou infekcí SARS-CoV-2, ale také u virus-naivních pacientů očkováných na čekací listině ještě před samotnou transplantací. V těchto skupinách jsme pozorovali nejen vysokou míru sérokonverze po očkování, ale také vysoké hladiny protilátek indukovaných vakcinací. Naopak u pacientů očkováných po transplantaci, kteří neprodělali covid-19, jsme potvrdili oslabenou postvakcinační humorální odpověď. Prokázali jsme tak významný vliv imunizace předchozí nákazou na tvorbu protilátek po očkování (tzv. hybridní imunita). Prodělání covidu-19 mělo také významný vliv na rozvoj buněčné imunity. Podařilo se nám identifikovat hlavní faktory asociované s porušenou tvorbou protilátek po očkování, kterými jsou zejména mykofenolát mofetil a podání depleční léčby v posledním roce před očkováním. Negativním faktorem je také vyšší věk. Přesto, že jsou první dva faktory potenciálně ovlivnitelné, nelze doporučit redukci imunosuprese v perivakcinačním období vzhledem k možnému riziku rejekce. Prioritou je, pokud možno, očkování pacientů ještě na čekací listině před realizací transplantace. Nakonec, očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny během sledovaného období nevedlo ke zhoršení funkce štěpu.

3. Syndrom frailty neboli syndrom geriatrické křehkosti je u starších virus-naivních pacientů po transplantaci ledviny asociován s porušenou humorální odpovědí po očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2. Z jednotlivých kritérií syndromu frailty je významným faktorem negativně ovlivňujícím postvakcinační sérokonverzi fyzická inaktivita.

Podarilo se nám zjiž tak vulnerabilní imunokompromitované populace identifikovat nejrizikovější skupinu pacientů. Potenciálně bychom u těchto pacientů mohli zlepšit rozvoj postvakcinační humorální imunity prevencí syndromu frailty a systematickou intervencí v případě pre-frail a frail pacientů v klinické praxi zaměřením se na částečně ovlivnitelné kategorie tohoto syndromu. Domníváme se, že základem prevence covidu-19 by měla být aplikace posilovacích dávek vakcín.

4. Očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny je u pacientů po transplantaci ledviny asociováno se snížením výskytu infekce virem SARS-CoV-2. V definovaném období vedlo očkování k 46% redukci rizika nákazy. Přesto tito pacienti zůstávají v riziku infekce a závažného průběhu covidu-19. Všichni pacienti po transplantaci ledviny by proto měli být očkováni posilovacími dávkami ve snaze zlepšit imunogenicitu a efektivitu vakcín v této populaci.

9. Souhrn

Předkládaná disertační práce se zabývá imunitní odpovědí pacientů po transplantaci ledviny v souvislosti s virem SARS-CoV-2. Podkladem této disertační práce jsou čtyři časově na sebe navazující původní práce. První práce z období před zahájením očkování analyzuje humorální imunitní odpověď po přirozené infekci SARS-CoV-2, přičemž výsledky srovnává s imunokompetentní populací. Další dvě studie se týkají imunitní odpovědi pacientů po transplantaci ledviny po očkování dvěma dávkami mRNA vakcíny proti SARS-CoV-2 včetně analýzy pacientů vyššího věku. Poslední studie analyzuje účinnost vakcín v rámci prevence infekce SARS-CoV-2 v této populaci.

Ukázalo se, že imunitní odpověď pacientů po transplantaci ledviny po infekci virem SARS-CoV-2 není porušena, jak by se dalo vzhledem k imunosupresivnímu stavu očekávat. Prokázali jsme závislost hladin postinfekčních protilátek na závažnosti průběhu covidu-19, do té doby pozorované pouze v obecné populaci. Zjistili jsme, že imunogenicita mRNA vakcín proti SARS-CoV-2 je slabá zejména u pacientů očkovaných po transplantaci, kteří nebyli imunizováni předchozí nákazou a doporučili jsme očkovat kandidáty na transplantaci ledviny ještě na čekací listině před vystavením vlivu imunosuprese. Podařilo se nám identifikovat několik rizikových faktorů horší imunitní odpovědi po očkování, ale také nejrizikovější skupinu pacientů po transplantaci, což jsou zejména jedinci ve věku 70 let a více v kategorii „frail“. Nakonec jsme prokázali, že i přes sníženou imunitní odpověď je očkování mRNA vakcínami spojeno se snížením výskytu infekce SARS-CoV-2. Nicméně riziko nákazy a závažného průběhu nemoci je v této populaci, zejména v případě starších pacientů, nadále vysoké. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že v souvislosti s infekcí SARS-CoV-2 by měla být základem prevence podpora aplikace posilovacích dávek vakcín a v případě zvýšeného výskytu nákazy samozřejmě dodržování všech nefarmakologických protiepidemických opatření.

10. Summary

The presented thesis deals with the immune response in kidney transplant recipients regarding SARS-CoV-2. The basis of this thesis are four subsequent original research studies. The first study from the pre-vaccination period analyzes the humoral immune response after natural SARS-CoV-2 infection in comparison with the immunocompetent population. Two other studies examine the immune response in kidney transplant recipients after vaccination with two doses of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 including an analysis of older patients. The latest study analyzes the effectiveness of vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection in this population.

We have shown that the immune response in kidney transplant recipients after SARS-CoV-2 infection is not impaired, as would be expected given the immunosuppressed state. We demonstrated the association between post-infection antibody levels and the severity of the course of covid-19, which until then had only been observed in the general population. We found that the immunogenicity of mRNA vaccines against SARS-CoV-2 is weak especially in patients vaccinated post-transplant who were not immunized with previous infection. We recommended vaccinating kidney transplant candidates while still on the waiting list prior to initiating immunosuppressive therapy. We were able to identify several risk factors associated with impaired immune response following vaccination. We also identified a group of patients who are at the highest risk, which are especially frail individuals at the age of 70 and older. Finally, we demonstrated that despite reduced immune response, mRNA vaccines are associated with lower SARS-CoV-2 infection rates. However, the risk of infection and severe course of the disease remains high in this population, especially among elderly patients. Based on these results, we conclude, that regarding SARS-CoV-2 infection, the basis for prevention should be the application of booster doses and of course in case of high rates of infection all non-pharmacological anti-epidemic preventive measures as well.

Seznam použité literatury

Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Butt AA; National Study Group for COVID-19 Vaccination. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *N Engl J Med.* 2021;385(2):187-189.

Akalin E, Azzi Y, Bartash R, et al. Covid-19 and Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 2020;382(25):2475-2477.

Amorim CEN, Gomes VLT, Cristelli MP, et al. High Prevalence of Long-COVID Among Kidney Transplant Recipients: A Longitudinal Cohort Study. *Transplantation.* 2022;106(12):2408-2415.

Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med.* 2022;386(16):1532-1546.

Arias-Cabrales C, Folgueiras M, Faura A, et al. Dynamics of Humoral and Cellular Responses in Renal Transplant Recipients Receiving 3 Doses of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *Transplantation.* 2023;107(2):457-465.

Aslam S, Adler E, Mekeel K, Little SJ. Clinical effectiveness of COVID-19 vaccination in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2021;23(5):e13705.

Baggen J, Jacquemyn M, Persoons L, et al. TMEM106B is a receptor mediating ACE2-independent SARS-CoV-2 cell entry. *Cell.* 2023;186(16):3427-3442.e22.

Baluch A, Humar A, Eurich D, et al. Randomized controlled trial of high-dose intradermal versus standard-dose intramuscular influenza vaccine in organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2013;13(4):1026-1033.

Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol.* 2021;6(62):eabl4340.

Benotmane I, Gautier-Vargas G, Wendling MJ, et al. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant.* 2020;20(11):3162-3172.

Benotmane I, Risch S, Doderer-Lang C, Caillard S, Fafi-Kremer S. Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2871-2875.

Bertrand D, Hamzaoui M, Drouot L, et al. SARS-CoV-2-specific Humoral and Cellular Immunities in Kidney Transplant Recipients and Dialyzed Patients Recovered From Severe and Nonsevere COVID-19. *Transplant Direct.* 2021;7(12):e792. Published 2021 Nov 17.

Bertrand D, Hamzaoui M, Lemée V, et al. Antibody and T Cell Response to SARS-CoV-2 Messenger RNA BNT162b2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(9):2147-2152.

Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, et al. Clinical and Analytical Performance of an Automated Serological Test That Identifies S1/S2-Neutralizing IgG in COVID-19 Patients Semiquantitatively. *J Clin Microbiol*. 2020;58(9):e01224-20.

Boyarsky BJ, Barbur I, Chiang TP, et al. SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccine Immunogenicity in Solid Organ Transplant Recipients With Prior COVID-19. *Transplantation*. 2021;105(11):e270-e271.

Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Immunogenicity of a Single Dose of SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*. 2021;325(17):1784-1786.

Braun F, Lütgehetmann M, Pfefferle S, et al. SARS-CoV-2 renal tropism associates with acute kidney injury. *Lancet*. 2020;396(10251):597-598.

Burack D, Pereira MR, Tsapepas DS, et al. Prevalence and predictors of SARS-CoV-2 antibodies among solid organ transplant recipients with confirmed infection. *Am J Transplant*. 2021;21(6):2254-2261.

Butler CC, Hobbs FDR, Gbinigie OA, et al. Molnupiravir plus usual care versus usual care alone as early treatment for adults with COVID-19 at increased risk of adverse outcomes (PANORAMIC): an open-label, platform-adaptive randomised controlled trial. *Lancet*. 2023;401(10373):281-293.

Caceres PS, Savickas G, Murray SL, et al. High SARS-CoV-2 Viral Load in Urine Sediment Correlates with Acute Kidney Injury and Poor COVID-19 Outcome. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(10):2517-2528.

Caillard S, Benotmane I, Gautier Vargas G, Perrin P, Fafi-Kremer S. SARS-CoV-2 viral dynamics in immunocompromised patients. *Am J Transplant*. 2021;21(4):1667-1669.

Callaghan CJ, Mumford L, Curtis RMK, et al. Real-world Effectiveness of the Pfizer-BioNTech BNT162b2 and Oxford-AstraZeneca ChAdOx1-S Vaccines Against SARS-CoV-2 in Solid Organ and Islet Transplant Recipients. *Transplantation*. 2022;106(3):436-446.

Centers for Disease Control and Prevention. Overview of Testing for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. Aktualizováno 9.1.2024. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>

Cerrada-Romero C, Berastegui-Cabrera J, Camacho-Martínez P, et al. Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Sci Rep*. 2022;12(1):7397.

Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, 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):100354.

Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature*. 2021;596(7872):417-422.

COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Aktualizováno 29.2.2024. <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>

Cucchiari D, Egri N, Bodro M, et al. Cellular and humoral response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21(8):2727-2739.

Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529):eabf4063.

Danthu C, Hantz S, Dahlem A, et al. Humoral Response after SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in a Cohort of Hemodialysis Patients and Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(9):2153-2158.

Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636-1643.

Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022;23(2):165-176.

Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2255-2273.

Favà A, Donadeu L, Sabé N, et al. SARS-CoV-2-specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant patients. *Am J Transplant*. 2021;21(8):2749-2761.

Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021;27(11):2032-2040.

Fernández-Ruiz M, Olea B, Giménez E, et al. SARS-CoV-2-specific Cell-mediated Immunity in Kidney Transplant Recipients Recovered From COVID-19. *Transplantation*. 2021;105(6):1372-1380.

Fried LP, Tangen CM, Walston J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):M146-M156.

Frölke SC, Bouwmans P, Messchendorp AL, et al. Adherence to preventive measures after SARS-CoV-2 vaccination and after awareness of antibody response in kidney transplant recipients in the Netherlands: a nationwide questionnaire study. *EClinicalMedicine*. 2023;62:102103. Published 2023 Jul 20.

- Galani IE, Rovina N, Lampropoulou V, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol.* 2021;22(1):32-40.
- Gong F, Wei HX, Li Q, Liu L, Li B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Front Mol Biosci.* 2021;8:682405. Published 2021 Jul 23.
- Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022;386(4):305-315.
- Grubaugh ND, Petrone ME, Holmes EC. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):529-530.
- Grupper A, Rabinowich L, Schwartz D, et al. Reduced humoral response to mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients without prior exposure to the virus. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2719-2726.
- Guo L, Wang G, Wang Y, et al. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet Microbe.* 2022;3(5):e348-e356.
- Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1017-1032.
- Hallam J, Jones T, Alley J, Kohut ML. Exercise after influenza or COVID-19 vaccination increases serum antibody without an increase in side effects. *Brain Behav Immun.* 2022;102:1-10.
- Hanley B, Naresh KN, Roufousse C, et al. Histopathological findings and viral tropism in UK patients with severe fatal COVID-19: a post-mortem study. *Lancet Microbe.* 2020;1(6):e245-e253.
- Hirzel C, Ferreira VH, L'Huillier AG, et al. Humoral response to natural influenza infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2019;19(8):2318-2328.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 2020;78(4):779-784.e5.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, 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):271-280.e8.
- Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 2020;182(2):429-446.e14.
- Hovd M, Åsberg A, Munthe LA, et al. Humoral vaccine response and breakthrough infections in kidney transplant recipients during the COVID-19 pandemic: a nationwide cohort study. *EClinicalMedicine.* 2023;60:102035.

World Health Organization 2023 data.who.int, WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. Navštíveno 13.3.2024. <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>

European Centre for Disease Prevention and Control. Transmission of COVID-19. Navštíveno 13.3.2024. <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/z-disease-list/covid-19/facts/transmission-covid-19>

World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19): Post COVID-19 condition. Aktualizováno 28.3.2023. [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)

Chakraborty C, Saha A, Bhattacharya M, Dhama K, Agoramoorthy G. Natural selection of the D614G mutation in SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant and its subvariants. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023;31:437-439.

Chavarot N, Leruez-Ville M, Scemla A, et al. Decline and loss of anti-SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients in the 6 months following SARS-CoV-2 infection. *Kidney Int*. 2021;99(2):486-488.

Isho B, Abe KT, Zuo M, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 2020;5(52):eabe5511.

Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20.

Jackson KR, Motter JD, Bae S, et al. Characterizing the landscape and impact of infections following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2021;21(1):198-207.

Johns Hopkins University & Medicine. Coronavirus Resource Center. Navštíveno 13.3.2024. <https://coronavirus.jhu.edu/region>

Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 2022;606(7914):576-584.

Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF-α and IFN-γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*. 2021;184(1):149-168.e17.

Kemlin D, Gemander N, Depickère S, et al. Humoral and cellular immune correlates of protection against COVID-19 in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2023;23(5):649-658.

Kho MML, Messchendorp AL, Frölke SC, et al. Alternative strategies to increase the immunogenicity of COVID-19 vaccines in kidney transplant recipients not responding to two or three doses of an mRNA vaccine (RECOVAC): a randomised clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 2023;23(3):307-319.

- Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021;27(7):1205-1211.
- Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020;181(4):914-921.e10.
- Klein J, Wood J, Jaycox JR, et al. Distinguishing features of long COVID identified through immune profiling. *Nature*. 2023;623(7985):139-148.
- Klein S, Cortese M, Winter SL, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun*. 2020;11(1):5885. Published 2020 Nov 18.
- Kolle AT, Lewis KB, Lalonde M, Backman C. Reversing frailty in older adults: a scoping review. *BMC Geriatr*. 2023;23(1):751. Published 2023 Nov 17.
- La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(6):1059-1061.
- Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(5):270-284.
- Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-582.
- Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019;50(4):907-923.
- Lederer K, Bettini E, Parvathaneni K, et al. Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals. *Cell*. 2022;185(6):1008-1024.e15.
- Li Q, Wu J, Nie J, et al. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*. 2020;182(5):1284-1294.e9.
- Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):656-657.
- Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant [published correction appears in N Engl J Med. 2023 Feb 16;388(7):672]. *N Engl J Med*. 2021;385(7):585-594.
- Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463-469.
- Major J, Crotta S, Llorian M, et al. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science*. 2020;369(6504):712-717.

Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39.

Manisty C, Otter AD, Treibel TA, et al. Antibody response to first BNT162b2 dose in previously SARS-CoV-2-infected individuals. *Lancet.* 2021;397(10279):1057-1058.

Marot S, Malet I, Leducq V, et al. Author Correction: Rapid decline of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 among infected healthcare workers. *Nat Commun.* 2021;12(1):2824. Published 2021 May 10.

Martin-Sancho L, Lewinski MK, Pache L, et al. Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction. *Mol Cell.* 2021;81(12):2656-2668.e8.

Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol.* 2020;19(11):919-929.

McAdams-DeMarco MA, Law A, King E, et al. Frailty and mortality in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2015;15(1):149-154.

Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell.* 2020;183(5):1340-1353.e16.

Menni C, May A, Polidori L, 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):1002-1010.

Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science.* 2022;375(6585):1122-1127.

Minkoff JM, tenOever B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):178-194.

Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE, et al. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5108-5113.

Moehling KK, Zhai B, Schwarzmann WE, et al. The impact of physical frailty on the response to inactivated influenza vaccine in older adults. *Aging (Albany NY).* 2020;12(24):24633-24650.

Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):186-193.

Mozaffari E, Chandak A, Gottlieb RL, et al. Remdesivir Reduced Mortality in Immunocompromised Patients Hospitalized for COVID-19 Across Variant Waves: Findings From Routine Clinical Practice. *Clin Infect Dis.* 2023;77(12):1626-1634.

National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison [published correction

appears in *Lancet Infect Dis.* 2020 Dec;20(12):e298]. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(12):1390-1400.

OpenSAFELY Collaborative, Parker EPK, Horne EMF, et al. Comparative effectiveness of two- and three-dose COVID-19 vaccination schedules involving AZD1222 and BNT162b2 in people with kidney disease: a linked OpenSAFELY and UK Renal Registry cohort study. *Lancet Reg Health Eur.* Published online May 3, 2023.

Paludan SR, Mogensen TH. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. *Sci Immunol.* 2022;7(67):eabm5505.

Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell.* 2020;183(4):1024-1042.e21.

Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-2615.

Predecki M, Clarke C, Gleeson S, et al. Detection of SARS-CoV-2 Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(12):2753-2756.

Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2020;383(6):590-592.

RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693-704.

Regele F, Heinzl A, Hu K, et al. Stopping of Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Recipients for 2 Weeks Peri-Vaccination Does Not Increase Response to SARS-CoV-2 Vaccination-A Non-randomized, Controlled Pilot Study. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:914424. Published 2022 Jun 10.

Romero-Olmedo AJ, Schulz AR, Hochstätter S, et al. Induction of robust cellular and humoral immunity against SARS-CoV-2 after a third dose of BNT162b2 vaccine in previously unresponsive older adults. *Nat Microbiol.* 2022;7(2):195-199.

Rozen-Zvi B, Yahav D, Agur T, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine among kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(8):1173.e1-1173.e4.

Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 2020;183(4):996-1012.e19.

Sadeghi A, Tahmasebi S, Mahmood A, et al. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. *J Cell Physiol.* 2021;236(4):2829-2839.

Sagar M, Reifler K, Rossi M, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest.* 2021;131(1):e143380.

- Sakhi H, Dahmane D, Attias P, et al. Kinetics of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibodies in Hemodialysis Patients Six Months after Infection. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(5):1033-1036.
- Salmerón Ríos S, Mas Romero M, Cortés Zamora EB, et al. Immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in frail or disabled nursing home residents: COVID-A study. *J Am Geriatr Soc*. 2021;69(6):1441-1447.
- Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4433-4448.
- Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA, et al. Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV-2 BNT162b2 (tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J Clin Invest*. 2021;131(14):e150175.
- Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020;183(1):158-168.e14.
- Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021;184(4):861-880.
- Sette A, Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol Rev*. 2022;310(1):27-46.
- Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(21):11727-11734.
- Schuler PB, Leblanc PA, Marzilli TS. Effect of physical activity on the production of specific antibody in response to the 1998-99 influenza virus vaccine in older adults. *J Sports Med Phys Fitness*. 2003;43(3):404.
- Sievers BL, Cheng MTK, Csiba K, Meng B, Gupta RK. SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the "goldilocks". *Cell Mol Immunol*. 2024;21(2):171-183.
- Soresina A, Moratto D, Chiarini M, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020;31(5):565-569.
- Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*. 1992;122(2):281-288.
- Sun J, Zheng Q, Madhira V, et al. Association Between Immune Dysfunction and COVID-19 Breakthrough Infection After SARS-CoV-2 Vaccination in the US. *JAMA Intern Med*. 2022;182(2):153-162.
- Sungnak W, Huang N, Bécavin C, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020;26(5):681-687.

- Szabo PA, Dogra P, Gray JJ, et al. Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19. *Immunity*. 2021;54(4):797-814.e6.
- Tarke A, Sidney J, Kidd CK, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med*. 2021;2(2):100204.
- Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):195-197.
- Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells [published correction appears in Nature. 2022 Jul;607(7920):E19]. *Nature*. 2022;604(7905):330-336.
- Thomson T, Predecki M, Gleeson S, et al. Immune responses following 3rd and 4th doses of heterologous and homologous COVID-19 vaccines in kidney transplant recipients. *EClinicalMedicine*. 2022;53:101642.
- Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol*. 2022;94(6):2376-2383.
- Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-1418.
- Venet M, Ribeiro MS, Décembre E, et al. Severe COVID-19 patients have impaired plasmacytoid dendritic cell-mediated control of SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2023;14(1):694. Published 2023 Feb 8.
- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):155-170.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein [published correction appears in Cell. 2020 Dec 10;183(6):1735]. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6.
- Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*. 2020;584(7821):430-436.
- Witkowski M, Tizian C, Ferreira-Gomes M, et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature*. 2021;600(7888):295-301.
- Wu H, Larsen CP, Hernandez-Arroyo CF, et al. AKI and Collapsing Glomerulopathy Associated with COVID-19 and *APOL1* High-Risk Genotype. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(8):1688-1695.
- Wu N, Joyal-Desmarais K, Ribeiro PAB, 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):439-452.

Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1831-1833.e3.

Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(11):685-700.

Yao X, Hamilton RG, Weng NP, et al. Frailty is associated with impairment of vaccine-induced antibody response and increase in post-vaccination influenza infection in community-dwelling older adults. *Vaccine*. 2011;29(31):5015-5021.

Yuan Z, Shao Z, Ma L, Guo R. Clinical Severity of SARS-CoV-2 Variants during COVID-19 Vaccination: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses*. 2023;15(10):1994.

Zeng C, Evans JP, King T, et al. SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(1):e2111400119.

Zhang S, Liu Y, Wang X, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):120.

Zhang Y, Chen Y, Li Y, et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(23):e2024202118.

Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [published correction appears in *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1038] [published correction appears in *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1038]. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [published correction appears in *Nature*. 2020 Dec;588(7836):E6]. *Nature*. 2020;579(7798):270-273.

Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-733.

Zohar T, Loos C, Fischinger S, et al. Compromised Humoral Functional Evolution Tracks with SARS-CoV-2 Mortality. *Cell*. 2020;183(6):1508-1519.e12.

Zuo J, Dowell AC, Pearce H, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection [published correction appears in *Nat Immunol*. 2021 Jul;22(7):928]. *Nat Immunol*. 2021;22(5):620-626.

Publikace

Původní vědecké práce s IF in extenso, které jsou podkladem disertace

Magicova M, Fialova M, Zahradka I, Rajnochova-Bloudickova S, Hackajlo D, Raska P, Striz I, Viklicky O. Humoral response to SARS-CoV-2 is well preserved and symptom dependent in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21(12):3926-3935. **IF 8,086**

Magicova M, Zahradka I, Fialova M, Neskudla T, Gurka J, Modos I, Hojny M, Raska P, Smejkal P, Striz I, Viklicky O. Determinants of Immune Response to Anti-SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Cohort Study. *Transplantation*. 2022;106(4):842-852. **IF 6,2**

Schmalz M, Vankova H, Rajnochova-Bloudickova S, Hrubá P, Fialova M, Gurka J, **Magicova M**, Striz I, Zahradka I, Viklicky O. The impact of frailty syndrome on humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in older kidney transplant recipients. *Int Urol Nephrol*. 2023;55(11):2959-2965. **IF 2,266**

Zahradka I, Petr V, Modos I, **Magicova M**, Dusek L, Viklicky O. Association Between SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines and Lower Infection Rates in Kidney Transplant Recipients: A Registry-Based Report. *Ann Intern Med*. 2022;175(7):961-968. **IF 39,2**

Další publikace:

a) s IF

- krátká sdělení:

Petr V, Zahradka I, Modos I, Roder M, Prewett A, Fialova M, Machkova J, Hrubá P, **Magicova M**, Slavcev A, Striz I, Viklicky O. First Booster of SARS-COV-2 mRNA Vaccine Is Not Associated With Alloimmunization and Subclinical Injury of Kidney Allograft. *Transplantation*. 2023;107(2):e62-e64. **IF 6,2**

Zahradka I, Tichanek F, **Magicova M**, Modos I, Viklicky O, Petr V. Morning Administration Enhances Humoral Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. Published online March 7, 2024. **IF 8,086**

- přehledový článek:

Magicová M, Viklický O. Covid-19 in kidney transplant recipients. Covid-19 u nemocných po transplantaci ledviny. *Vnitř Lek*. 2022;68(7):444-448. **IF 0,25**

b) bez IF

• přehledové články:

Magicová M, Zahradka I, Viklický O. Covid-19 po transplantaci ledviny: co je nového? *Postgraduální nefrologie*. 2022;20(2):10-14.

Viklický O, **Magicová M, Zahradka I.** Imunitní odpověď na COVID-19 u nemocných po transplantaci ledviny. *Aktuality v nefrologii*. 2022;28(3):76-79.

• kazuistiky:

Magicová M, Novotný M, Slatinská J, Viklický O. Hluboká žilní trombóza jako primární manifestace COVID 19 u pacienta po transplantaci ledviny. *Postgraduální nefrologie*. 2020;18(4):38-40.

Čižmárová M, Bachroňová P, Krátká K, Rychlík I. HCO hemodialýza jako součást léčby akutního poškození ledvin indukovaného rhabdomyolýzou. *Postgraduální nefrologie*. 2018;16(3):31-34.