

lek. Kamil Adamczyk

Diagnostyka zaburzeń smaku jako metoda badań przesiewowych w COVID-19

Rozprawa na stopień doktora
Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie: nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Edward Franek



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2021

Podziękowania

Autor składa serdecznie podziękowania prof. dr. hab. n. med. Edwardowi Frankowi za wprowadzenie w tajniki warsztatu badawczego, otwartość oraz troskę podczas pisania niniejszej pracy. Autor dziękuje za niezliczone godziny konsultacji, za wyjątkową wyrozumiałość i cierpliwość.

Gorące podziękowania autor składa mł. bryg. dr Barbarze Szykule – Piec oraz bryg. dr inż. Robertowi Piec ze Szkoły Głównej Służby Pożarniczej za pomoc w organizacji badań do niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania autor składa bryg. dr inż. Robertowi Piec za cierpliwość oraz niezastąpioną pomoc w przeprowadzeniu analizy statystycznej.

Spis Treści

2. STRESZCZENIE I SŁOWA KLUCZOWE W JĘZYKU POLSKIM	7
3. STRESZCZENIE I SŁOWA KLUCZOWE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	10
4. WSTĘP	13
4.1 Pandemia SARS-CoV-2.....	13
4.2 Epidemiologia COVID-19	17
4.2.1. COVID-19 u osób dorosłych (18-60 lat)	17
4.2.2. COVID-19 kobiet w ciąży oraz noworodków	18
4.2.3. COVID-19 u dzieci	19
4.2.4. COVID-19 u osób w podeszłym wieku (>60 lat)	20
4.4. Obecnie stosowane metody diagnostyczne COVID-19, ich skuteczność i ograniczenia	21
4.4.1 Szybkie testy przeciwciał i antygenów	22
4.4.2 Testy amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification tests – NAAT)	22
4.4.3 Wyniki testów serologicznych.....	23
4.4.4 Badania radiologiczne.....	23
4.5. Szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV-2	24
4.5.1. Szczepionki bazujące na osłabionym koronawirusie.....	25
4.5.2. Szczepionki bazujące na inaktywowanym koronawirusie.....	26
4.5.3. Szczepionki bazujące na białku wirusowym	27
4.5.4. Szczepionki bazujące na nagim DNA.....	27
4.5.5. Szczepionki RNA.....	28
4.5.6. Szczepionki wykorzystujące wektor wirusowy	28
4.6. Mutacje wirusa SARS-CoV-2.....	29
4.6.1. Wariant Alfa.....	30
4.6.2. Wariant Beta	31

4.6.3. Wariant Gamma	31
4.6.4. Wariant Delta	31
4.7. Zaburzenia smaku i węchu.....	32
4.7.1. Zaburzenia smaku i węchu związane z procesami chorobowymi	32
4.7.2. Wirusowa dysfunkcja węchu (ang. post-viral olfactory dysfunction – PVOD)	33
4.7.3. Zaburzenia smaku i węchu w COVID-19.....	34
4.8. Doniesienia o aktualnym wykorzystaniu zaburzeń smaku i węchu w diagnostyce COVID-19.....	39
5. CELE PRACY	41
6. MATERIAŁ I METODY	42
6.1. Opis ogólny materiału i metody zastosowanej w pracy.....	42
6.2.1. Opis szczegółowy fazy pilotażowej mającej na celu określenie stężeń substancji smakowych testowanych w fazie głównej.....	42
7. ANALIZA STATYSTYCZNA	47
8. OPIS WYNIKÓW BADAŃ	48
8.1. Faza Pilotażowa	48
8.2. Faza główna	49
8.2.1. Objawy podmiotowe uczestników badania	49
8.2.2. Zaburzenia smaków stwierdzone obiektywnymi testami	53
8.2.3. Wartość predykcyjna poszczególnych testerów smaku.....	55
9. Dyskusja	59
10. Podsumowanie i wnioski.....	77
11. Supplement	79
12. Spis tabel i rycin.....	84
13. Bibliografia	86

1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ARDS	ang. acute respiratory distress syndrome – zespół ostrej niewydolności oddechowej
ACE2	ang. angiotensin-converting enzyme 2 – enzym konwertujący angiotensynę 2
BK	bradykinina
BMI	ang. Body Mass Index – wskaźnik masy ciała
BMS	ang. burning mouth syndrome – zespół pieczenia w jamie ustnej
COVID-19	ang. coronavirus disease 2019 – ostra choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2
ECMO	ang. ExtraCorporeal Membrane Oxygenation – ciągłe pozaustrojowe natlenianie krwi
ENaC	ang. epithelial sodium channel – nabłonkowy kanał sodowy
FDA	ang. Food and Drug Administration – Agencja Żywności i Leków
GDP	guanozynodifosforan
GMP	guanozynomonofosforan
GPCR	ang. G Protein-Coupled Receptor – receptory sprzężone z białkami G
GTP	guanozotrifosforan
IMP	monofosforan inozyny
NPV	ang. negative predictive value – ujemna wartość prognostyczna
POVD	ang. post-viral olfactory dysfunction – powirusowe zaburzenie węchu i smaku
PPV	ang. positive predictive value – dodatnia wartość prognostyczna
PROP	6-n-propylotiouracyl
RBD	ang. receptor-binding domain – domena wiążąca receptor
ROC AUC	ang. area under the receiver operating characteristic curve – pole pod krzywą ROC
RT-PCR	ang. reverse transcription polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
SGSP	Szkoła Główna Służby Pożarniczej w Warszawie
SOR	szpitalny oddział ratunkowy

T1R2	ang. taste receptor type 1 members 2 – receptor smaku typ 1 rodzaj 2
T1R3	ang. taste receptor type 1 members 2 – receptor smaku typ 1 rodzaj 3
TAS2R	ang. taste receptors type 2 – receptory smaku typu 2
TAS2R38	ang. bitterness-sensing protein taste receptor type-2 member 38 – białkowy receptor smaku gorzkiego typu 2 numer 38
TMPRSS2	ang. transmembrane serine protease 2 – przezbłonowa proteaza serynowa 2
TRPV1	ang. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 – receptor dla kanału kationowego z podrodziny V, członek 1
WHO	ang. World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia
wirus	ang. positive single-stranded RNA virus – wirus z pojedynczą nicią RNA
ssRNA (+)	o dodatniej polaryzacji

2. STRESZCZENIE I SŁOWA KLUCZOWE W JĘZYKU POLSKIM

Założenia i cel pracy:

Zakaźna choroba koronawirusowa COVID-19 (ang. coronavirus disease 2019) została po raz pierwszy rozpoznana i opisana w Wuhan w Chinach w grudniu 2019 r. W marcu 2020 r. została ogłoszona pandemią przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Choroba ta jest wywoływana przez powodującego zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej koronawirusa SARS-CoV-2, będącego wirusem z pojedynczą nicią o dodatniej polaryzacji ssRNA (+), należącym do rodziny Coronaviridae.

W chwili pisania niniejszej pracy, na dzień 13 marca 2021 roku, na całym świecie zgłoszono ponad 120 milionów zakażeń SARS-CoV-2 i 2 660 000 zgonów z powodu wirusa stawiając śmiertelność z powodu COVID-19 na poziomie około 2%. Jest to największa pandemia w XXI wieku. Liczne badania wykazały, że zaburzenia smaku są jednymi z najczęstszych objawów COVID-19. Niniejsza praca miała na celu ocenę charakterystyki zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19 oraz stworzenie testu przesiewowego wykrywającego zakażenie SARS-CoV-2, bazującego na zaburzeniach smaku.

Cele pracy to:

1. Ocena charakterystyki zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19, z uwzględnieniem zaburzeń poszczególnych smaków.
2. Stworzenie modelu predykcyjnego zakażenia wirusem SARS-CoV-2 bazującego na obiektywnych testach smaku.
3. Porównanie skuteczności modeli predykcyjnych bazujących na subiektywnych symptomach COVID-19 z modelami bazującymi na obiektywnych testach smaku.

Material i metoda:

Oceniono występowania ewentualnych zaburzeń smaku słodkiego, słonego, kwaśnego i gorzkiego u 52 osób z grupy badanej z zakażeniem SARS-CoV-2 (51 mężczyzn, średni wiek 21,7 lat) i 36 osób z grupy kontrolnej bez zakażenia SARS-CoV-2 (34 mężczyzn, średni wiek

20,8 lat) przy użyciu tabletek smakowych (sacharoza, NaCl, kwas askorbinowy i ekstrakt z grejpfruta – 99% naringina) o stężeniach substancji smakowych ustalonych wcześniej u osób zdrowych w badaniu pilotażowym. Wykorzystano również kwestionariusz medyczny dotyczący subiektywnych objawów COVID-19 składający się z pytań o utratę smaku, węchu i obecności gorączki w ciągu ostatniego miesiąca.

Wyniki:

Odczuwanie smaków słodkiego i słonego było istotnie statystycznie zaburzone w grupie pacjentów COVID-19 w porównaniu do grupy kontrolnej. Kwestionariusz medyczny miał wyższą czułość i wartość diagnostyczną (pole pod krzywą ROC) niż jakikolwiek obiektywny test smaku. Pojedynczym testerem smaku o najwyższej czułości i wartości diagnostycznej w diagnostyce zakażenia SARS-CoV-2 był tester smaku słodkiego o stężeniu sacharozy 40 mg/ml. Zaproponowano dwa modele predykcyjne zakażenia SARS-CoV-2:

1. model przesiewowy składający się z kwestionariusza medycznego (zgłaszana przez pacjenta utrata smaku, węchu lub gorączki; wynik dodatni, jeśli obecny jest co najmniej jeden objaw) i/lub hipogeuzja słodkiego smaku, o czułości 87%; i specyficzności 55%.

2. model diagnostyczny obejmujący ageuzję smaku słodkiego lub słonego, o czułości 34% i swoistości 100%.

Wnioski:

- I. Zakażenie wirusem SARS-CoV-2 wpływa na percepcję smaków, upośledzając selektywnie odczuwanie smaku słodkiego oraz słonego. Zaburzenia te mają charakter hipogeusii zależnej od stężenia substancji smakowej. Całkowita ageusia w grupie chorych COVID-19 jest bardzo rzadka.
- II. Pojedynczym testerem smaku o najwyższej wartości diagnostycznej zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (najwyższa wartość ROC-AUC), wśród testerów smaku, a zarazem najwyższej czułości, wśród testerów smaku, był tester smaku słodkiego o stężeniu sacharozy 40 mg/ml.
- III. Modelem predykcyjnym bazującym na obiektywnych testach smaków, o najwyższej czułości był model składający się z kwestionariusza medycznego dotyczącego

subiektywnych objawów COVID-19 oraz badania testerem smakowym Słodki 1 (stężenie sacharozy 40 mg/ml) – model przesiewowy.

- IV. Modelem predykcyjnym bazującym na obiektywnych testach smaków, o najwyższej swoistości był model składający się z badania testerami smakowymi: Słony 1 (stężenie chlorku sodu 13,5 mg/ml), Słony 2 (stężenie chlorku sodu 17 mg/ml), Słodki 3 (stężenie sacharozy 106,4 mg/ml) – model diagnostyczny.
- V. Wartość diagnostyczna (wartość ROC-AUC) modelu predykcyjnego bazującego na subiektywnych symptomach COVID-19 (tzw. kwestionariusz medyczny) okazała się nieznacznie wyższa niż modeli predykcyjnych bazujących na obiektywnych testach smaku. W sytuacjach epidemiologicznych wymagających obiektywizacji badań przesiewowych wskazane może być użycie obiektywnych testów smaku niezależnie lub łącznie z kwestionariuszem medycznym.

Słowa kluczowe:

COVID-19, SARS-CoV-2, zaburzenia smaku

3. STRESZCZENIE I SŁOWA KLUCZOWE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Background and aim of the study:

The infectious coronavirus disease COVID-19 (coronavirus disease 2019) was first identified and depicted in Wuhan, China in December 2019. In March 2020 the World Health Organization declared the COVID-19 outbreak a pandemic. The disease is caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, a single strand positive polarity ssRNA (+) virus belonging to the Coronaviridae family, which causes severe acute respiratory distress syndrome.

At the time of writing this paper, as of March 13, 2021, more than 120 million SARS-CoV-2 infections and 2,660,000 deaths from the virus have been reported worldwide, putting the COVID-19 mortality rate of approximately 2%. It is the greatest pandemic of the 21st century. Several studies have shown that taste disturbance is one of the most common symptoms of COVID-19. The aim of this study was to evaluate the characteristics of taste disturbances during COVID-19 and to create a screening test for SARS-CoV-2 infection, based on taste disturbances.

The aim of the work was:

1. Assessment of the characteristics of taste disturbances in the course of COVID-19, taking into account the disturbances of particular tastes.
2. Development of a predictive model of SARS-CoV-2 virus infection based on the objective taste test.
3. Comparison of the effectiveness of predictive models based on subjective COVID-19 symptoms with models based on the objective taste test.

Material and method:

The occurrence of possible sweet, salty, sour, and bitter taste disturbances was assessed in 52 people from the study group with SARS-CoV-2 infection (51 men, mean age 21.7 years) and 36 people from the control group without SARS-CoV-2 infection (34 men, mean age 20.8 years) using flavored tablets (sucrose, NaCl, ascorbic acid and grapefruit extract - 99%

naringin) with the flavor concentrations previously established in healthy subjects in a pilot study. A medical questionnaire on subjective COVID-19 symptoms was also used, consisting of questions about the loss of taste, smell, and presence of fever during the last month.

Results:

The perception of sweet and salty tastes was statistically significantly impaired in the COVID-19 group as compared to the control group. The medical questionnaire had a higher sensitivity than any other objective taste test. The single taste tester with the highest sensitivity in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection was the sweet taste tester with a sucrose concentration of 40 mg / ml. Two predictive models for SARS CoV-2 infection have been proposed:

1. a screening model consisting of a medical questionnaire (patient-reported loss of taste, smell, or fever; positive if at least one symptom is present) and / or sweet taste hypogeusia, sensitivity of 87% and a specificity of 55%.

2. a diagnostic model including sweet or salty taste hypogeusia, with a sensitivity of 34% and a specificity of 100%.

Conclusion:

I. Infection with SARS-CoV-2 virus affects the perception of tastes, selectively impairing the perception of sweet and salty taste. These disturbances consist of hypogeusia corresponding to the concentration of the flavor substance. Ageusia in the COVID-19 group is very rare.

II. The single taste tester with the highest diagnostic value (the highest ROC-AUC value) for SARS-CoV-2 virus infection, among taste testers and, at the same time, the highest sensitivity among taste testers, was the sweet taste tester with a sucrose concentration of 40 mg / ml.

III. The predictive model based on objective taste tests, with the highest sensitivity, was the model consisting of the medical questionnaire on subjective symptoms of COVID-19 and the Sweet 1 tester test (sucrose concentration 40 mg / ml) – the screening model.

IV. The predictive model based on objective taste tests, with the highest specificity, was the model consisting of the following testers: Salty 1 (sodium chloride concentration 13.5 mg/ml),

Salty 2 (sodium chloride concentration 17 mg / ml), Sweet 3 (sodium chloride concentration sucrose 106.4 mg / ml) - the diagnostic model.

V. The diagnostic value (ROC-AUC value) of the predictive model based on subjective COVID-19 symptoms (medical questionnaire) was higher than the predictive models based on the objective taste tests. In epidemiological situations requiring the screening tests to be objective, it may be advisable to use taste tests independently or in conjunction with a medical questionnaire.

Keywords:

COVID-19, SARS-CoV-2, taste disturbances

4. WSTĘP

4.1 Pandemia SARS-CoV-2

Pierwszy opis ludzkiego koronawirusa pochodzi z 1965 roku (1). Dotychczas koronawirusy były przyczyną dwóch epidemii: SARS w 2002-2003 oraz MERS w 2012 roku. W pracy z grudnia 2018 roku naukowcy z chińskiego Instytutu Wirusologii w Wuhan przestrzegali przed zdolnością koronawirusów do szerzenia się ze zwierząt na ludzi (2). Zakaźna choroba koronawirusowa COVID-19 (z ang. coronavirus disease 2019) została po raz pierwszy rozpoznana i opisana właśnie w Wuhan, w Chinach, w grudniu 2019 r. W marcu 2020 r. została ogłoszona pandemią przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Choroba ta jest wywoływana przez wirusa zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej SARS-CoV-2, będącego wirusem z pojedynczą nicią o dodatniej polaryzacji ssRNA (+) należącym do rodziny Coronaviridae (3). Dokładne źródło zwierzęce nie zostało jeszcze poznane, jednak większość koronawirusów pochodzi od nietoperzy, a SARS-CoV-2 jest w około 88% genetycznie podobny do szczepu zidentyfikowanego u tych zwierząt. Gospodarzem pośrednim jest prawdopodobnie łuskowiec, ssak zamieszkujący Afrykę i Południową Azję, charakteryzujący się dachówkowato ułożonymi łuskami pokrywającymi ciało zwierzęcia. Wirus SARS-CoV-2 wydaje się powstać z połączenia materiału genetycznego koronawirusów zidentyfikowanych u łuskowców i nietoperzy (4).

W chwili pisania niniejszej pracy, na dzień 6 września 2021 roku, na całym świecie zgłoszono ponad 219 milionów zakażeń SARS-CoV-2 i 4 550 000 zgonów (5) co stanowi około 2% śmiertelność z powodu COVID-19. Jest to dotychczas największa epidemia w XXI wieku. Dla porównania z innymi epidemiami w obecnym stuleciu: wirusem SARS latach 2002-2003 zakażonych zostało 8096 osób z czego 774 osób zmarło (6), z powodu wirusa świńskiej grypy w latach 2009-2010 zmarło około 284 tys. osób (7), z powodu bliskowschodniego zespół oddechowego wywołanego przez wirusa MERS spośród 2494 potwierdzonych przypadków 858 osób zmarło (8), w trakcie epidemii gorączki krwotocznej Ebola w Afryce Zachodniej w latach 2014-2016 zmarło ponad 11 tys osób spośród 28 tys zakażonych (9). Wcześniejsze epidemie cechowały się jeszcze większą śmiertelnością. Epidemia HIV/AIDS, od roku 1981 do chwili obecnej – 32 miliony zgonów (10), grypa hiszpanka, lata 1914-1918 – 50 milionów zgonów (11), epidemie dżumy: pierwsza, nazywana

dzumą Justyniana, w latach 541-544, między 15 a 100 milionów zgonów (12), druga, zwana czarną śmiercią, w latach 1346-1353, największa pandemia w historii ludzkości – około 200 milionów zgonów (13), trzecia, w latach 1855-1959 – około 15 milionów zgonów (14).

Do zakażenia wirusem SARS-CoV-2 dochodzi głównie drogą kropelkową (15-22). Drugą prawdopodobną drogą transmisji wirusa jest droga powietrzna (aerozol) (23-26). W tych warunkach wirus pozostaje wykrywalny przez wiele godzin od rozpylenia, z czasem półtrwania około godziny (27). Kolejnym potwierdzonym źródłem transmisji są zakażone powierzchnie, gdzie wirus utrzymuje się od kilku godzin, do kilku dni, w zależności od rodzaju powierzchni, temperatury, wilgotności czy stopnia nasłonecznienia (27-31). Do transmisji dojść może także drogą fekalno-oralną (32). Z tego powodu tak ważne jest utrzymywanie higieny osobistej, częste mycie rąk i dezynfekcja powierzchni.

Zakażenie drogą kropelkową ma miejsce, gdy infekcja przenoszona jest poprzez ekspozycję na cząsteczki śliny i innych płynów z dróg oddechowych, powstających podczas kichania, kaszlu czy mówienia. Wektorem są duże kropelki oddechowe (ang. large respiratory droplets) o wielkości powyżej 5 μm . Jest to główna droga zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Na podstawie dotychczasowych badań, przyjmuje się, że cząsteczki transmitujące koronawirusa mają co najmniej 4,7 μm średnicy (33), same zaś cząsteczki wirusa SARS-CoV-2 mają średnicę od 0,07 μm do 0,09 μm (34, 35). Uważa się, że wirus rozprzestrzenia się drogą kropelkową na odległość około 1,5 metra od osoby zakażonej – stąd właśnie taką odległość przyjmuje się w wielu krajach, w tym w Polsce, jako odległość dystansu społecznego.

Do transmisji drogą powietrzną dochodzi poprzez aerozol, czyli cząsteczki o średnicy mniejszej niż 5 μm . Cząsteczki te (ang. small respiratory droplets and droplet nuclei) rozprzestrzeniają się na odległości znacznie przekraczającą 2 metry (36-39). W badaniu van Doremalen wykazali, że SARS-CoV-2 utrzymuje się w aerozolu przez 16 godzin a czas połowicznej żywotności wirusa w tym środowisku to 0,5-3,3 godzin (27). Droga kropelkowa i powietrzna są ze sobą powiązane, gdyż np. kropelki płynów ustrojowych wydobywające się podczas kaszlu lub kichania mogą przekształcić się w aerozol w mniej niż 1 sekundę (40). Dodatkowo wiele procedur medycznych generuje aerozol, między innymi: intubacja dotchawicza, tracheostomia, otwarte odsysanie, bronchoskopia czy resuscytacja krążeniowo-oddechowa.

Transmisja przez kontakt bezpośredni występuje, gdy zarażamy się wirusem poprzez interakcję z osobą zakaźną, np. podczas uścisku dłoni, a także dotykając przedmioty lub powierzchnie, które zostały skażone, a następnie materiał zakaźny ma kontakt ze śluzówkami jamy ustnej, nosowej czy spojówkami oczu. W badaniu przeprowadzonym przez Santarpi i wsp. wykazano, że 70.6% przedmiotów osobistych osób przebywających w izolatoriach bądź szpitalach COVID-19 jest skontaminowanych wirusem SARS-CoV-2 (41). Stabilność wirusa jest największa na stali i plastiku, gdzie wykrywany jest on na ponad 72 godziny od kontaminacji. Wirus wykrywany jest na kartonie do 24 godzin a na miedzi do 4 godzin od kontaminacji (27).

Wirus SARS-CoV-2 jest uważany za bardzo zaraźliwy, z podstawową liczbą reprodukcyjną (R_0) szacowaną na około 2,5 (42). Inne badania wskazywały na wartości od 2,2 (43), 2,7 (44) a nawet około 6 w Nowym Jorku (45) czy Wuhan (46). Współczynnik R_0 mówi o tym, ile osób średnio zaraża jeden nosiciel wirusa; kiedy R_0 jest większe niż 1, epidemia rozwija się. Dla porównania początkowa liczba R_0 dla wcześniejszych pandemii wynosiła: dla grypy A H1N1 (tzw. świńskiej grypy) z 2009 roku – 1,7 (47), dla grypy A H1N1 z 1918 roku (tzw. hiszpanki) – około 2 (48), dla ospy prawdziwej – 4-5 (49). Inne choroby wirusowe mają jeszcze wyższe współczynniki R_0 : różyczka – 7-8 (50), odra – 12-18 (51).

Na COVID-19 chorują tak samo często mężczyźni jak i kobiety, chociaż przebieg choroby u mężczyzn jest cięższy. Są oni częściej hospitalizowani na oddziałach intensywnej terapii i większa jest w ich grupie śmiertelność, niezależnie od wieku (52). Być może, związane jest to z większą ekspresją receptora ACE2 w płucach u mężczyzn (53). Szacuje się, że około 20% zakażeń wirusem SARS-CoV-2 jest bezobjawowych (54). U większości pacjentów występują objawy grypopodobne, takie jak: gorączka, ból gardła, kaszel, bóle mięśni, osłabienie, zaburzenia smaku, utrata węchu i katar. W około 15% przypadków ciężka infekcja rozwija się bez wcześniejszych objawów. W ciężkich przypadkach stwierdza się zapalenie płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej, zatorowość płucną, niekiedy także kardiomiopatię, prowadzącą w wybranych przypadkach do śmierci (55). Około 15% krytycznie chorych na COVID-19 wymaga stosowania ciągłej terapii nerkozastępczej (56). Obecnie podstawą diagnozy COVID-19 jest reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) na próbkach z dróg oddechowych, która wykrywa wybrane geny otoczki specyficzne dla wirusa SARS-CoV-2 (57). Strategie profilaktyczne, takie jak dystans

społeczny, regularne mycie i dezynfekcja rąk, stosowanie maseczek lub przyłbic zakrywających twarz, są, jak dotąd, najbardziej skuteczne w kontrolowaniu rozprzestrzeniania się choroby (58, 59). W badaniach klinicznych udowodniono, że dopuszczenie do użytku szczepionek przeciwko SARS-CoV-2 spowalnia rozprzestrzenianie się wirusa w populacji (60). Szczepionki przeciwko SARS-CoV-2 zdają się być nie tylko skuteczne, ale i bezpieczne (61). W chwili obecnej problemem jest jednak dostępność szczepionek, w szczególności w krajach rozwijających się (62). Według raportu Duke Global Health Innovation Center, około 9 na 10 osób mieszkających w 70 najbiedniejszych krajach świata nie będzie miało dostępu do szczepionek do 2023 roku lub później (63).

W chwili obecnej nie istnieje celowane leczenie przeciwko SARS-CoV-2. Terapia opiera się głównie na leczeniu objawowym. Pacjenci w stanie ciężkim i krytycznym leczeni są według wytycznych bazujących na terapii sepsy (64). Na uwagę zasługują jednak doniesienia wskazujące na potrzebę rutynowego stosowania leczniczych dawek leków przeciwwkrzepliwych u krytycznie chorych w COVID-19 co skutkuje niższą śmiertelnością w tej grupie chorych (65). W wybranych przypadkach stosuje się leki przeciwwirusowe takie jak np. remdesivir – lek opracowany do leczenia gorączki krwotocznej Ebola i choroby marburskiej (66). Niedawne wyniki badań klinicznych wskazują ponadto na skuteczność Baricitynibu – inhibitora kinaz JAK1 i JAK2, mającego działanie immunomodulujące. Stosowany razem z remdesiwirem, skracał objawy choroby COVID-19 (67).

Kolejnym lekiem który poprawie rokowanie chorych na COVID-19, zmniejszając ilość dni z ciężką niewydolnością wielonarządową oraz zmniejszając śmiertelność 90-dniową jest tocilizumab – antagonist receptoru interleukiny 6 (68). Wykorzystanie osocza ozdowieńców w terapii COVID-19 jest kwestią dyskusyjną. Randomizowane, prospektywne badanie Simonovich i wsp. na 334 pacjentach nie wykazało korzyści ze stosowania osocza ozdowieńców (69). Badanie to przeprowadzone było głównie na pacjentach w średnim stanie ogólnym. Jedynie 18 z 334 chorych wymagało tlenoterapii wysokoprzepływową. Żaden z pacjentów objętych badaniem nie wymagał wentylacji mechanicznej. Inne retrospektywne badanie Liu i wsp. na 39 pacjentach w stanie ciężkim (27 pacjentów wymagało tlenoterapii wysokoprzepływową, 4 zaś respiratoroterapii) wykazało poprawę przeżycia w grupie badanej (70). Metaanaliza dostępnych badań wskazuje, że osocze ozdowieńców nie zmniejsza śmiertelności ani nie wpływa korzystnie na przebieg choroby (71).

Sterydoterapia i leki przeciwzapalne stosowane są w celu skrócenia czasu do wypisu (72). Pacjenci z ciężkim przebiegiem choroby COVID-19 wymagają tlenoterapii biernej, tlenoterapii wysokoprzepływowej (73), w najcięższych przypadkach mogą wymagać intubacji i wentylacji mechanicznej (74) a w skrajnych przypadkach nawet pozaustrojowego utlenowania krwi (ang. extracorporeal membrane oxygenation- ECMO) (75). U części chorych w przebiegu COVID-19 dochodzi do ciężkiego, nieodwracalnego włóknienia płuc (76). Ratunkiem dla tej grupy chorych jest wyłącznie przeszczep płuc (77).

Helms i wsp. opisują przedłużające się delirium i/lub encefalopatię związaną z wentylacją mechaniczną u większości pacjentów (84.3%) COVID-19 po zakończonej respiratoroterapii na oddziale intensywnej terapii (78).

4.2 Epidemiologia COVID-19

4.2.1. COVID-19 u osób dorosłych (18-60 lat)

Do rozprzestrzeniania się wirusa dochodzi najczęściej drogą kropelkową. Za zakaźne uważa się osoby na 1 do 3 dni przed wystąpieniem objawów (79). Możliwa jest również transmisja wirusa przez osoby bezobjawowe lub w okresie presymptomatycznym (79-81). W opublikowanych dotychczas modelach matematycznych przyjmuje się, że za większość zakażeń odpowiedzialni są nosiciele asymptotyczni (82, 83). W przeglądzie systematycznym Cochrane zidentyfikowano 27 objawów COVID-19 które podzielone zostały na cztery główne kategorie: ogólnosystemowe, oddechowe, gastroenterologiczne oraz sercowo- naczyniowe. Spośród nich sześć uważanych jest za swoiste „czerwone flagi” czyli objawy z bardzo dużym prawdopodobieństwem wskazujące na zakażenie wirusem SARS-CoV-2. Objawy te to: gorączka, bóle mięśni, bóle stawów, zmęczenie oraz ból głowy (84).

W trakcie epidemii SARS (wywołanej wirusem SARS-CoV-1) w latach 2002-2004, wykazano związek między grupą krwi a podatnością na zakażenie wirusem. Pacjenci z grupą krwi 0 byli mniej podatni na zakażenie wirusem (85). Badanie Latz i wsp. wykazało, że w przypadku wirusa SARS-CoV-2 jest podobnie (86). W populacji 1289 objawowych dorosłych pacjentów COVID-19 ze Stanów Zjednoczonych, objętych powyższym badaniem, krwi B, AB

oraz Rh+ była związana z większym ryzykiem dodatniego wyniku w kierunku wirusa SARS-CoV-2, grupa 0 natomiast z mniejszym ryzykiem dodatniego wyniku.

4.2.2. COVID-19 kobiet w ciąży oraz noworodków

Nadal nie przeprowadzono zbyt wielu badań dotyczących epidemiologii COVID-19 u kobiet w ciąży. Niektóre wstępne raporty sugerują, że choroba ta nie ma dużego wpływu na ciążę. Jest to zaskakujące gdyż publikacje opisujące przebieg ciąży przy zakażeniu wirusem SARS-CoV-1 podawały wskaźniki poronień sięgający 25% (87). Chociaż zakażenie wertykalne płodu w COVID-19 występuje stosunkowo rzadko, udokumentowano przezłożyskowe zakażenia płodów wirusem SARS-CoV-2 (88). W populacji włoskiej ponad dwie trzecie ankietowanych kobiet obawia się zakażenia wertykalnego płodu wirusem SARS-CoV-2 (89). Tego typu obawy mają negatywny wpływ na kondycję psychiczną kobiet w ciąży, w tym zwiększony lęk związany z ciążą (89, 90). Udowodniono, że zwiększony lęk związany z ciążą może przełożyć się na zwiększoną liczbę porodów przedwczesnych oraz niską masę urodzeniową noworodków (91). W metaanalizie badań przeprowadzonych wśród kobiet z COVID-19 w ciąży wykazano, że choroba ta prowadzi do zwiększenia odsetka porodów przedwczesnych oraz cięć cesarskich (92, 93).

Na zwiększony lęk związany z ciążą może mieć także wpływ zmniejszenie częstości osobistych wizyt kontrolnych w trakcie ciąży, związane z obawą przed zakażeniem koronawirusem (90). W analizie amerykańskiej populacji kobiet w ciąży nie zaobserwowano jednak zwiększonego ryzyka zakażenia wirusem spowodowanego odbywaniem lekarskich wizyt kontrolnych w trakcie ciąży (94). Domniemywać należy więc, iż położnicy powinni zachęcać kobiety pozostające pod ich opieką do regularnych, osobistych wizyt kontrolnych, także w trakcie pandemii.

Należy zwrócić szczególną uwagę na powikłania zakrzepowe u kobiet w ciąży, gdyż zarówno sama ciąża jak i COVID-19 zwiększa ryzyko tych powikłań (95, 96). Podobnie jak w przypadku populacji osób dorosłych wykazano związek z grupą krwi pacjentki a ryzykiem dodatniego testu SARS-CoV-2. W brytyjskim badaniu Ahmed i wsp. wykazali, że w analizowanej populacji kobiet w ciąży grupa krwi A wiązała się z większym ryzykiem zachorowania na COVID-19 w porównaniu do innych grup krwi (97). Wyniki innej metaanalizy wskazują, że jedne z najczęstszych objawów zakażenia wirusem SARS-CoV-2:

gorączka i kaszel, wydają się występować rzadziej u kobiet w ciąży niż w populacji ogólnej. Może być to związane ze zmianami w układzie immunologicznym kobiet w ciąży (98).

4.2.3. COVID-19 u dzieci

Choroba COVID-19 występuje głównie u osób dorosłych. U dzieci występuje rzadziej, ma u nich mniej gwałtowny przebieg i lepsze rokowanie (99, 100). Pacjenci poniżej 18 roku życia stanowią od 1 do 8% potwierdzonych laboratoryjnie przypadków COVID-19 w zależności od kraju (101-106). Badanie przeprowadzone przez Dong Y i wsp. (107) na populacji chińskich dzieci wykazało, że im młodszy był wiek dziecka, tym większy występował odsetek przypadków ciężkich i krytycznych w analizowanej grupie. W grupie powyżej 15 lat odsetek ten wynosił 3%, u dzieci poniżej pierwszego roku życia – 10,6%. Jeszcze wyższy odsetek przypadków krytycznych, wśród dzieci poniżej 1 r.ż., wynoszący 14%, przedstawia metaanaliza 48 prac obejmującej 5829 pacjentów pediatrycznych COVID-19 (108). W innej metaanalizie badań opisujących COVID-19 u dzieci, odsetek pacjentów w stanie krytycznym, wśród pacjentów do 18 roku życia, wyniósł 4% (99). W międzynarodowym, wielośrodkowym badaniu europejskim wskazano, że czynnikiem ryzyka przyjęcia do oddziału intensywnej terapii, w populacji dziecięcej, były: wiek poniżej 1 miesiąca życia, płeć męska, choroby współistniejące oraz zapalenie dolnych dróg oddechowych przy przyjęciu (109). W przeglądzie systematycznym Liguoro i wsp. śmiertelność COVID-19 u dzieci wyniosła 0,08% (6 na 7480 przypadków) (110).

W europejskim badaniu Götzingera i wsp. (109) obejmującym 582 pacjentów pediatrycznych COVID-19, najczęstszymi objawami przy przyjęciu były: gorączka (65%), zakażenie górnych dróg oddechowych (54%), ból głowy (28%), infekcja dolnych dróg oddechowych (25%) i objawy żołądkowo-jelitowe (22%). U pacjentów pediatrycznych, tak jak w przypadku populacji osób dorosłych, raportowano współwystępowanie COVID-19 z zaburzeniami sercowo-naczyniowymi (111-113), głównie zapaleniem mięśnia sercowego oraz niewydolnością nerek (114, 115).

4.2.4. COVID-19 u osób w podeszłym wieku (>60 lat)

W populacji osób starszych (powyżej 60 lat) transmisja dokonuje się w tym samym mechanizmie co u osób poniżej 60 r.ż. Osoby starsze są jednak bardziej narażone na wystąpienie cięższych i nietypowych objawów w porównaniu ze zdrowymi dorosłymi. U starszych dorosłych występują nietypowe objawy takie jak ból gardła, majaczenie czy tachykardia (116). Saturacja krwi tętniczej poniżej 93%, bez tlenoterapii, przy przyjęciu do szpitala, jest niezależnym czynnikiem zwiększonej śmiertelności u osób starszych (117). U starszych dorosłych w wieku od 70 do 80 lat śmiertelność wynosi 8%, czyli więcej niż u osób dorosłych. W wieku powyżej 80 lat śmiertelność z powodu COVID-19 wzrasta do 14% (101). Wyższa śmiertelność w podeszłym wieku związana jest z występowaniem chorób współistniejących, wśród których choroby układu krążenia, cukrzyca, nadciśnienie, przewlekła niewydolność nerek, otyłość i przewlekła obturacyjna choroba płuc są związane z cięższym przebiegiem COVID-19 (118-121).

4.3. Objawy kliniczne COVID – 19

Objawy kliniczne COVID-19 są bardzo zróżnicowane – od bezobjawowych, po przypadki z ostrą niewydolnością oddechową. Najczęstsze objawy to: gorączka, kaszel, ból gardła, ból głowy, zmęczenie, bóle mięśni i duszności – objawy bardzo podobne do innych chorób układu oddechowego. U części pacjentów choroba przebiega w sposób bardzo gwałtowny- rozwija się ciężkie zapalenie płuc, niewydolności oddechowa która doprowadza do śmierci pod koniec pierwszego tygodnia od zakażenia. Badania laboratoryjne potwierdzają obecność cytokin zapalnych. Średni czas od zakażenia do wystąpienia pierwszych objawów to 5 dni, do hospitalizacji – 7 dni a do rozwinięcia ostrej niewydolności oddechowej – 8 dni. Średnio około 25 do 30% pacjentów wymaga intensywnej terapii. Choroba ma cięższy przebieg w populacji osób w podeszłym wieku, zwłaszcza cierpiących na choroby współistniejące, takie jak cukrzyca, nadciśnienie i choroby układu krążenia. Szacuje się, że śmiertelność wynosi od 2 do 3% (122).

Badanie przeprowadzone przez Lechienę i wsp. (123) na populacji 1420 pacjentów z łagodnym i umiarkowanymi COVID-19 w 18 europejskich szpitalach wykazało następującą częstość występowania symptomów COVID-19: bóle głowy (70,3%), zaburzenie węchu (70,2%), niedrożność nosa (67,8%), kaszel (63,2%), astenia (63,3%), bóle mięśni (62,5%),

katar (60,1%), zaburzenie smaku (54,2%), ból gardła (52,9%), gorączka (45,4%). Z kolei metaanaliza Zhang i wsp. (124) obejmująca 4203 pacjentów COVID-19 wykazała, że najczęstszymi objawami choroby były gorączka (80.5%), kaszel (58.3%) i duszność (23.8%). U pacjentów COVID-19 najczęstszymi chorobami współistniejącymi były nadciśnienie tętnicze (16.4%), choroby układu krążenia (12.1%) i cukrzyca (9.8%).

Głównym powikłaniem ciężkiej infekcji SARS-CoV-2 jest zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS). Duszność i ostra niewydolność oddechowa to główne objawy tego zespołu. Niejednokrotnie zaburzenia te doprowadzają do konieczności wdrożenia respiratoroterapii. Oprócz powikłań oddechowych, ciężki przebieg COVID-19 związany jest z zaburzeniami sercowo- naczyniowymi. Należą do nich między innymi: uszkodzenie mięśnia sercowego, arytmie, kardiomiopatie i niewydolność serca (125). Kolejnym bardzo częstym powikłaniem jest ostre uszkodzenie nerek, często wymagające terapii nerkozastępczej (126, 127). Badania wskazują ponadto, że u chorych z ciężkim przebiegiem COVID-19 występuje zwiększone ryzyko powikłań neurologicznych, takich jak encefalopatia lub ostry udar niedokrwienny mózgu (128). Jednym z najpoważniejszych powikłań COVID-19 jest koagulopatia objawiająca się zakrzepicą w różnych narządach, w tym zatorowością płuc, będącą niejednokrotnie powikłaniem śmiertelnym (129, 130).

4.4. Obecnie stosowane metody diagnostyczne COVID-19, ich skuteczność i ograniczenia

Szybkie i skuteczne testy są niezbędne do kontrolowania rozprzestrzeniania się wirusa, ponieważ aby skutecznie izolować pacjentów zakażonych oraz prowadzić dochodzenia epidemiologiczne potrzebny jest ciągły wzrost liczby wykonywanych testów diagnostycznych. Najczęstszą metodą diagnostyczną jest wykrywanie wirusowego RNA w wymazach pobranych z nosogardła, z wykorzystaniem metody PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (ang. reverse transcription PCR – RT-PCR). Bronchoskopia w celu pobrania próbki do badań nie jest wskazana, ponieważ ryzyko zakażenia się operatora jest bardzo wysokie (131). Bardzo ważne jest, aby wziąć pod uwagę bezpieczeństwo osobiste osób pobierających próbki – zaleca się stosowanie pełnej odzieży ochronnej. Przegląd niektórych technik diagnostycznych przedstawiono szczegółowo poniżej.

4.4.1 Szybkie testy przeciwciał i antygenów

Na rynku dostępnych jest coraz więcej urządzeń ambulatoryjnych, które mogą być używane do wykrywania przeciwciał IgM, IgA oraz IgG przeciwko SARS-CoV-2 metodą przepływu bocznego (ang. lateral flow test – LFT). Z ich pomocą możliwe jest uzyskanie szybkich wyników zakażenia SARS-CoV-2, już po 15 minutach, co jest szczególnie ważne w przypadku bezobjawowych nosicieli. Skuteczność tego typu testów zależy od populacji, w której przeprowadzane są testy. W badaniu, w którym sprawdzano skuteczność zatwierdzonego przez FDA testu „Sofia antigen test” czułość i swoistość wyniosła odpowiednio 80.0% i 98.9% w populacji symptomatycznej, lecz w populacji asymptomatycznej jedynie 41.2% i 98.4% (132). Niedawno opracowano również test antygenowy, który wykorzystuje szybką reakcję PCR z sondami fluorescencyjnymi kwasu nukleinowego (ang. PCR Fluorescent Probe Method). Niewątpliwie jest to kolejne przydatne narzędzie do szybkiego wykrywania nosicieli wirusa, jednak w chwili obecnej testy bazujące na tej metodzie nie są dokładne i generują zbyt wiele wyników fałszywie ujemnych (133) a oficjalne dane dotyczące skuteczności testów bazują często na małej symptomatycznej populacji, w której to efektywność testów jest sztucznie zawyżana (134).

4.4.2 Testy amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification tests – NAAT)

Standardowym testem potwierdzającym przypadki COVID-19 jest wykrycie wirusowego kwasu nukleinowego, czyli RNA, metodą RT-PCR na próbkach z górnych dróg oddechowych, takich jak wymazy z nosogardła. Geny, które były celem testów amplifikacji, obejmują geny N, E, S, ORF i RdRp (135). Wstępne testy były ukierunkowane na geny ORF1b i N w celu przeprowadzenia testu ilościowego. Później stwierdzono, że test genu E wirusa SARS-CoV-2 jest bardziej czuły niż testy innych genów. Test E jest wystarczający do stwierdzenia obecności infekcji, ale w celu uzyskania pozytywnego wyniku zaleca się wykonanie testu wykrywającego gen RdRp (136, 137). Największym ograniczeniem metody RT-PCR są ograniczenia ilości komercyjnych zestawów. Są one co prawda obecnie JAMA. 2020;323(13):1239-1242.ne, jednak nie w wystarczającej ilości do przetestowania zdecydowanej większości populacji. W związku z tym, proces badań przesiewowych bazujący na tej metodzie jest nadal powolny. Ponad to, istnieje ryzyko zanieczyszczenia materiału

biologicznego a wykonanie testów jest procesem długotrwałym, opóźniającym interwencję i dochodzenie epidemiologiczne (131).

4.4.3 Wyniki testów serologicznych

Chociaż wiele badań wykazało obecność wirusa SARS-CoV-2 we krwi i próbkach kału, badanie morfologiczne oraz badanie kału nie jest przydatne do stwierdzenia zakażenia. Badania serologiczne mogą pomóc w ustaleniu protokołu leczenia i potrzeby wykonania ewentualnych dalszych badań. U pacjentów przyjmowanych do szpitala z zapaleniem płuc stwierdzić można leukopenię, limfopenię oraz podwyższoną aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej (131). Wydaje się, także, że podwyższone stężenie troponiny jest bezpośrednio skorelowane ze śmiertelnością i można je uznać za czynnik prognostyczny zwiększonej śmiertelności (138). Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) także uznawane jest za wskaźnik prognostyczny COVID-19. W badaniu Ruan i wsp. (139) średnie stężenie CRP wśród osób zmarłych z powodu COVID-19 wyniosło 125 mg/l, podczas gdy w grupie osób, które przeżyły infekcję COVID-19 średni poziom wyniósł 40 mg/l. Także interleukina 6 zdaje się być markerem ciężkości przebiegu COVID-19 (140). W badaniach wykazano związek między początkowymi stężeniami IL-6 powyżej 80 pg/ml a ciężką niewydolnością oddechową (ARDS) oraz zwiększoną śmiertelnością (141). Także inny marker – dehydrogenaza mleczanowa w surowicy (ang. serum lactate dehydrogenase – LDH) okazał się skuteczny w ocenie ciężkości klinicznej i monitorowania odpowiedzi na leczenie w zapaleniu płuc COVID-19 (142).

4.4.4 Badania radiologiczne

W objawowych przypadkach, w regionach dużego zagęszczenia epidemiologicznego wirusa jako test potwierdzający zakażenie można przeprowadzić badanie tomografii komputerowej klatki piersiowej. Jest to wskazane tylko w przypadkach, gdy testy laboratoryjne nie są dostępne bądź na ich wyniki trzeba oczekiwać bardzo długo. Zaletą tomografii komputerowej jest to, że w niektórych przypadkach może pomóc w identyfikacji dodatniego pacjenta, nawet jeśli wynik testu RT-PCR okazał się fałszywie negatywny. W chińskim badaniu przeprowadzonym na 1041 pacjentach, 88% z nich miało pozytywny wynik testu CT, podczas gdy tylko około 56% miało pozytywny wynik testu RT-PCR (143). Pomimo, iż badanie RT-PCR było badaniem referencyjnym autorzy wskazują, iż znaczna dysproporcja między tymi wynikami może być związana z wynikami fałszywie ujemnymi badań

genetycznych. Cechą charakterystyczną COVID-19 w badaniu TK są obustronne zaciemnienia i zlewne zagęszczenia miąższu płuc. Może wystąpić obraz mleczej szyby i naciek w obu płucach. W ciężkich przypadkach może mieć miejsce konsolidacja płuc i wysięk opłucnowy. Badanie tomografii komputerowej klatki piersiowej wydaje się być przydatne do oceny ciężkości zakażenia COVID-19 (136).

4.5. Szczepionki przeciwko wirusowi SARS-CoV-2

Ze względu na pilną potrzebę opracowania i przetestowania szczepionki na wirusa SARS-CoV-2 w trakcie pandemii COVID-19 w wielu krajach na świecie wprowadzono przyspieszone procedury dopuszczenia nowych szczepionek. Wcześniej podobne sytuacje miały miejsce w przypadku pandemii grypy H1N1, Eboli i wirusa Zika. Szczepionka przeciwko wirusowi grypy H1N1 została opracowana relatywnie szybko głównie dlatego, że technologia szczepień przeciwko grypie w momencie wybuchu epidemii była dosyć dobrze opanowana. Inaczej było ze szczepionkami przeciwko Eboli oraz wirusowi Zika. Tych szczepionek nie udało się stworzyć przed końcem epidemii (144). Proces tworzenia nowej szczepionki jest wyjątkowo długi i kosztowny. Zanim wytypowana zostanie optymalna substancja do testów zwierzęcych i ludzkich, wiele innych substancji eliminowanych jest często już na etapie badań przedklinicznych (145).

Genom wirusa SARS-CoV-2 został odkryty na przełomie listopada i grudnia 2019 roku w Chinach (146). Od tego momentu zidentyfikowane zostały kluczowe elementy wirusa odpowiedzialne za infekcję komórek gospodarza (białko szczytowe S) oraz receptor, z którym łączy się wirus (ACE2). Odkrycia te (147) dostarczyły niezbędnych informacji do rozpoczęcia prac nad szczepionką przeciwko SARS-CoV-2.

W chwili pisania niniejszej pracy, na dzień 6 września 2021 roku w bazie WHO zarejestrowanych jest 297 projektów szczepionek przeciw SARS-CoV-2. Spośród nich, 185 znajdują się w fazie przedklinicznej, 112 zaś w fazie klinicznej (148). Zatwierdzonych do użycia (149) w trybie awaryjnym lub zwykłym na świecie jest obecnie 12 szczepionek (tabela 1). Na dzień 6 września 2021 roku podano na całym świecie ponad 5,48 miliarda dawek szczepionek na COVID-19. Pełną dawką zaszczepionych zostało 2,18 mld osób, co stanowi około 28% populacji światowej (149).

Tabela 1. Zatwierdzone do użycia szczepionki przeciw SARS-CoV-2 (na podstawie (149)).

	Producent	Nazwa szczepionki	Mechanizm działania	Skuteczność	Kraje zatwierdzające
1.	Pfizer-BioNTech	Comirnaty	mRNA	95%	USA, UE, inne kraje
2.	Moderna	mRNA-1273	mRNA	94,5%	USA, EU, inne kraje
3.	Oxford-AstraZeneca	ChAdOx1	DNA w adenowirusie	62%-90%	Wielka Brytania, Indie, inne kraje
4.	Gamaleya	Sputnik V	DNA w adenowirusie	91,4%	Rosja, Węgry, Serbia, Białoruś, inne kraje
5.	CanSino	Convidecia	DNA w adenowirusie	nieznana	Chiny
6.	Vector Institute	EpiVacCorona	Białko wirusa	nieznana	Rosja
7.	Sinopharm- Pekin	BBIBP-CorV	Inaktywowany koronawirus	79,34%	Chiny, Bahrajn, ZEA, Egipt
8.	Sinovac	CoronaVac	Inaktywowany koronawirus	50,38%	Chiny, Brazylia
9.	Sinopharm-Wuhan	nieznana	Inaktywowany koronawirus	nieznana	Chiny, ZEA
10.	Bharat Biotech	Covaxin	Inaktywowany koronawirus	nieznana	Indie
11.	Serum Institute of India	Covishield	Inaktywowany koronawirus	70,4%	Indie, Bangladesz
12.	Johnson and Johnson	Ad26.COV2.S	DNA w adenowirusie	61%-72%	Unia Europejska, USA,

4.5.1. Szczepionki bazujące na osłabionym koronawirusie

Szczepionki tego typu bazują na osłabionych, jednak wciąż żywych wirusach. Wiąże się to oczywiście z pewnym zagrożeniem biologicznym, biorąc pod uwagę fakt, iż do wytworzenia inaktywowanych wirusów należy przeprowadzić hodowlę wirusów, które

na pewnym etapie swojego rozwoju mogą wykazywać pełną aktywność. Następnie wirusy hodowane są w niesprzyjających warunkach (co je osłabia,) bądź selekcionowane są osłabione genetycznie szczepy wirusa. Biorąc pod uwagę, że do organizmu gospodarza wprowadzany jest żywy wirus, spodziewać się można licznych działań niepożądanych takiej szczepionki. Preparaty tego typu mogą być podawane drogą doustną bądź donosową.

Obecnie aktywne są jedynie 3 projekty tego typu szczepionek (150), żadna z nich nie weszła w fazę badań klinicznych:

1. The Serum Institute of India, Indie, we współpracy z Codagenix, prywatną nowojorską firmą biotechnologiczną pracującą nad szczepionką CDX-005,
2. Indian Immunologicals Ltd, Indie, we współpracy z Uniwersytetem Griffith w Australii,
3. Uniwersytet Mehmeta Ali Aydunar, Turcja, opracowujący szczepionkę OZG-3861 (151).

4.5.2. Szczepionki bazujące na inaktywowanym koronawirusie

Ta technologia produkcji szczepionki polega na całkowitej inaktywacji wirusa. W przypadku indyjskiej szczepionki Covaxin (152), oraz chińskich szczepionek Coronavac (153) i BBIBP-CorV (154) do tego celu wykorzystano substancję o nazwie beta-propiolakton, która łącząc się z materiałem genetycznym wirusa, uniemożliwia jego replikację. Szczepionki wytworzone tą tradycyjną metodą są łatwiejsze w przechowywaniu i tańsze niż szczepionki mRNA. Minusem tej technologii jest jednak krótkotrwała odpowiedź immunologiczna na szczepionkę, wymagająca podania większych dawek preparatu bądź stosowania silnych adjuwantów. Wszystkie szczepionki tego typu muszą być podawane domięśniowo.

Obecnie aktywnych jest kilka projektów tego typu szczepionek, spośród których 5 zostało dopuszczonych do obrotu w wybranych krajach (150):

1. Sinopharm – Pekin, Chiny – szczepionka BBIBP-CorV,
2. Sinopharm – Wuhan, Chiny,
3. Sinovac, Chiny – CoronaVac,
4. Bharat Biotech, Indie – Covaxin,

5. Serum Institute of India, Indie – Covishield.

4.5.3. Szczepionki bazujące na białku wirusowym

Jednymi z kluczowych struktur umożliwiającymi wirusowi penetrację do komórki gospodarza są białka S (ang. spike – kolec) wirusa, łączące się z receptorami infekowanych komórek. Większość obecnie opracowywanych, jak i istniejących szczepionek, bazuje właśnie na białku S. Szczepionka białkowa firmy Novavax (155), będąca obecnie w 3 fazie badań klinicznych, skonstruowana jest w ten sposób, że gen kodujący białko szczytowe S koronawirusa, umieszczony został w bakulowirusie. Są to wirusy owadów, od wielu lat wykorzystywane jako wektory genetyczne (156). Następnie, takim zmodyfikowanym genetycznie wirusem zainfekowano komórki śmy- wykorzystując je jako bioreaktor do produkcji białek S wirusa (157). Tak wytworzone białka S są ekstrahowane z komórki śmy i podawane razem z adiuwantem do mięśnia osoby szczepionej.

Obecnie aktywnych jest kilka projektów tego typu szczepionek, spośród których 1 została dopuszczona do obrotu na rynku rosyjskim (150):

1. Wektor State Research Center of Virology and Biotechnology, Rosja – EpiVacCorona.

4.5.4. Szczepionki bazujące na nagim DNA

Obecnie nie ma żadnej szczepionki z nagim DNA zarejestrowanej do użytku dla ludzi, jednak szczepionki tego typu wykorzystywane są od lat w weterynarii (158). Ponadto obecnie toczą się badania kliniczne z wykorzystaniem szczepionek z nagim DNA u ludzi – w szczepionkach przeciwko wirusowi Zika oraz HPV (159-161). Główny problem tej technologii polega na niskiej immunogenności nagiego DNA, którego ujemny ładunek nie pozwala na przenikanie przez błonę komórkową (162). Dopiero połączenie cząsteczki DNA z nanocząsteczkami chitozanu- organicznego związku chemicznego z grupy polisacharydów, pochodnej chityny, rozwinęło tę technologię szczepień (162). Alternatywą może być krótki impuls elektryczny (elektroporacja) stosowany w momencie wykonania szczepienia, umożliwiającą wniknięcie DNA do komórki (163). Plusem tej technologii jest

stabilność takiej szczepionki. Po wnikięciu do organizmu gospodarza DNA transkrybowane jest na mRNA. Kolejnym etapem jest translacja mRNA na sekwencje aminokwasów białka będącego antygenem szczepionkowym.

Żadna z kilku znajdujących się w fazie badań klinicznych nie została jeszcze dopuszczona do obrotu. W 3 fazie badań klinicznych znajdują się obecnie 2 szczepionki DNA (164):

1. Inovio, USA – INO-4800,
2. AnGes, Japonia – AG0302-COVID19.

4.5.5. Szczepionki RNA

Szczepionki RNA nie były do tej pory stosowane u ludzi. Obecnie dopuszczone do obrotu produkty firm Pfizer-BioNTech oraz Moderna są pierwszymi tego typu na rynku. W większości szczepionek mRNA kodujące białko S wirusa SARS-CoV-2 przenoszone jest przez mikropęcherzyki lipidowe (liposomy). Szczepionki te cechują się niską stabilnością- muszą być przechowywane w temperaturze od -30 do -80 ° C.

Obecnie zostały dopuszczone do obrotu dwie szczepionki. Ponadto dwie inne znajdują się w trzeciej fazie badań klinicznych (164):

Dopuszczone do użytku:

1. Pfizer-BioNTech, USA/Niemcy – Comirnaty,
2. Moderna, USA – mRNA-1273.

W 3 fazie badań klinicznych:

1. BioNTech-Pfizer, USA/Niemcy – BNT162b1,
2. Curevac, Niemcy – CVnCoV.

4.5.6. Szczepionki wykorzystujące wektor wirusowy

W celu dostarczenia materiału genetyczny do komórki gospodarza (w przypadku większości szczepionek- białko S otoczki wirusa), wykorzystać można inne wirusy. Zazwyczaj do tego celu wybierane są wirusy niewystępujące u człowieka. Stosowane wektory wirusowe mogą móc replikować się w organizmie człowieka bądź być takiej możliwości pozbawione.

Istnieje jednak obawa, iż preparaty bazujące na wirusach które zachowały zdolność replikacji mogą wzbudzać silną odpowiedź immunologiczną (165). Tego typu szczepionki podawane są głównie domięśniowo, jednak trwają prace nad szczepionką podawaną donosowo – gdzie wirus zostanie zneutralizowany w śluzówce i nie będzie wnikać do organizmu gospodarza (150).

Obecnie zostały dopuszczone do obrotu cztery szczepionki bazujące na wektorze niereplikującym. Następny preparat znajduje się w 3 fazie badań klinicznych (164):

Dopuszczone do użytku:

1. CanSino, Chiny – Ad5-nCoV,
2. Narodowe Centrum Epidemiologii i Mikrobiologii Gamaleya, Rosja – Sputnik V,
3. Uniwersytet Oxforda, W. Brytania / AstraZeneca, Szwecja – AZD1222,
4. Serum Institute of India, Indie – Covishield,
5. Johnson & Johnson, USA – Ad26.COV2.S.

Dodatkowo w 2 fazie badań klinicznych znajduje się 5 projektów szczepionek na wektorach replikujących.

4.6. Mutacje wirusa SARS-CoV-2

Długość genomu SARS-CoV-2 wynosi ponad 30 kPz (tysięcy par zasad) kodujących 14 białek (166). Wirus ewoluuje w tempie około dwóch nukleotydów każdego miesiąca (167). Najnowsze analizy wskazują zmianę ponad 20 nukleotydów w stosunku do genomu wirusa wyizolowanego w Wuhan w styczniu 2020 roku (168). Większość z tych mutacji występuje w domenie wiążącej receptor (ang. receptor-binding domain – RBD) białka szczytowego (białka S) otoczki wirusa. To ten obszar warunkuje zdolność wirusa do wiązania się z receptorami ACE2 występującymi na błonie komórkowej gospodarza, a co za tym idzie, warunkuje zakaźność wirusa. W tabeli 2 przedstawiono szczególnie niebezpieczne warianty wirusa SARS-CoV-2.

Tabela 2. Szczególnie niebezpieczne warianty wirusa SARS-CoV-2 (ang. Variants of Concern), na podstawie (169).

Nazwa wariantu	Oznaczenie wariantu	Kraj pierwszej identyfikacji	Opis
Alfa	B.1.1.7	Wielka Brytania	Pojawił się w Wielkiej Brytanii w grudniu 2020 roku. Uważa się, że jest około 50 procent bardziej zaraźliwy.
Beta	B.1.351	Południowa Afryka	Pojawił się w Afryce Południowej w grudniu 2020 roku. Zmniejsza skuteczność niektórych szczepionek.
Gamma	P.1	Brazylia	Pojawił się w Brazylii pod koniec 2020 roku. Ma mutacje podobne do B.1.351.
Delta	B.1.617.2	Indie	Pierwsze doniesienia o tej mutacji pojawiły się pod koniec 2020 roku w Indiach. Szacuje się, że wariant delta jest bardziej zakaźny (o ok. 50-70%) niż pozostałe odmiany koronawirusa.

4.6.1. Wariant Alfa

Nowy wariant B.1.1.7 wirusa SARS-CoV-2 został po raz pierwszy zidentyfikowany w listopadzie 2020 roku w Anglii (170). Spośród wielu mutacji kluczowe znacznie zdaje się mieć mutacja N501Y białka szczytowego S, zwiększająca zdolność wiązania się wirusa z białkiem receptorowym ACE2 (171, 172). Mutacje w białku szczytowym S są prawdopodobnie przyczyną fałszywie ujemnych testów przeprowadzanych przy pomocy sondy RT-PCR – Thermofisher TaqPath wykorzystującej do detekcji właśnie białko szczytowe (173). Dodatni wynik testu PCR przy ujemnym wyniku sondy TaqPath zdaje się być markerem nowego wariantu B.1.1.7. Badania przeprowadzone na zwierzętach sugerują zwiększoną zakaźność tego wariantu wirusa (174). Dane z Anglii potwierdzają, że nowy wariant koronawirusa ma zakaźność większą o 40% do 70%, co zwiększa podstawową liczbą reprodukcyjną (R_0) o 0,4 (175). W najnowszej pracy Davies i wsp. opisują także, że wariant

B.1.1.7 cechuje się śmiertelnością wyższą o 61% w porównaniu z dotychczasowymi wariantami wirusa SARS-CoV-2 (176).

4.6.2. Wariant Beta

Wariant B.1.351, znany także jako wariant 20H/501Y.V2, został po raz pierwszy zidentyfikowany w Południowej Afryce w grudniu 2020 roku. Największe obawy związane są z opornością tego wariantu na dostępne szczepionki. Badania wskazują, że szczepionki AstraZeneka i Pfizer-BioNTech nadal działają na ten wariant SARS-CoV-2, jednak produkują ponad 8-9 razy mniej przeciwciał w porównaniu do oryginalnego szczepu koronawirusa (177). Wariant ten dzieli kluczową mutację białka szczytowego S-N501Y z wariantem brytyjskim a ponadto zawiera substytucję E484K w domenie wiążącej receptor (ang. receptor-binding domain – RBD). Udokumentowano ponowne zakażenia wariantem B.1.1.351 (178).

4.6.3. Wariant Gamma

Wariant znany jako 20J/501Y.V3 pochodzi z linii P.1, odgałęzienia większej linii B.1.1.28. Wariant został po raz pierwszy zgłoszony w Japonii, u czterech osób, które zachorowały na P.1 podczas podróży do Brazylii. Linia ta pojawiła się pod koniec 2020 roku w Manaus, największym mieście w brazylijskiej Amazonii. Szybko stał się wariantem dominującym tam i w kilku innych miastach Ameryki Południowej. Podobnie do wariantu południowo afrykańskiego, z wariantem brytyjskim dzieli mutację N501Y oraz posiada mutację E484K. Badania wskazują, że P.1 pojawił się jako część drugiego wzrostu w Manaus w Brazylii, pomimo wysokiej wcześniejszej seroprewalencji SARS-CoV-2 w populacji. Udokumentowano ponowne zakażenia wariantem P.1, a także innym pokrewnym wariantem brazylijskim P.2, który również zawiera mutację E484K (179).

4.6.4. Wariant Delta

Wariant znany jako B.1.617.2, po raz pierwszy zidentyfikowany został w Indiach w grudniu 2020 r. Wśród, w większości nieszczepionej populacji indyjskiej, wariant ten spowodował ogromną liczbę hospitalizacji i zgonów. W Wielkiej Brytanii i innych krajach Europejskich wariant Delta również szybko się rozprzestrzenił, jednak dzięki dużo większej ilości przeprowadzonych szczepień odnotowano znacznie wolniejszy wzrost liczby hospitalizacji i zgonów. Dane z Wielkiej Brytanii dotyczące skuteczności szczepionek

sugerują, że 1 dawka szczepionki Pfizer-BioNTech lub AstraZeneca jest niewystarczająca do ochrony przed objawową infekcją wariantem Delta. Jednak już 2 dawki tych szczepionek zwiększają skuteczność ochrony odpowiednio do 88% i 67%. Jest to jednak wciąż gorsza ochrona niż przed wariantem Alpha (180).

4.7. Zaburzenia smaku i węchu

4.7.1. Zaburzenia smaku i węchu związane z procesami chorobowymi

Węch i smak pozwalają nam czerpać przyjemność ze spożywanych potraw, jednak mogą również działać jako wczesne sygnały ostrzegawcze przed truciznami, zanieczyszczeniami, dymem itp. Zaburzenia węchu i smaku mogą niekorzystnie wpływać na jakość życia i wpływać na wiele innych problemów zdrowotnych, zwłaszcza w populacji osób starszych. Ageusia (utrata smaku) i anosmia (utrata smaku) są najczęściej spowodowane infekcjami dróg oddechowych i zapaleniem zatok, niemniej jednak występowanie tych schorzeń może czasami wskazywać na poważniejsze patologie i może być pomocne we wczesnym rozpoznaniu pewnych schorzeń, zwłaszcza u osób starszych. Do pozostałych częstych przyczyn zaburzeń smaku zalicza się infekcje jamy ustnej, porażenie Bella i zażywanie niektórych leków. Kliniką ocenę zaburzeń zapachu i smaku można przeprowadzić na podstawie wywiadu medycznego, badania fizykalnego, testów laboratoryjnych i niektórych technik obrazowania w celu sprawdzenia zmian strukturalnych w układach oddechowym i nerwowym (181).

Zaburzenia węchu często wskazują na obecność chorób neurodegeneracyjnych. Ponad 95% pacjentów z idiopatycznym zespołem Parkinsona cierpi na dysfunkcję węchu, będącą jednym z pierwszych objawów choroby (182). Dzięki temu badanie węchu wykorzystywane jest jako badanie przesiewowe w tej chorobie. U osób cierpiących na chorobę Huntingtona także występują umiarkowane zaburzenia węchu (183). Choroba Alzheimera to kolejna choroba neurodegeneracyjna, która powoduje zaburzenia węchu (184). Podobnie jak w przypadku choroby Parkinsona, choroba Alzheimera charakteryzuje się również wczesnym początkiem zaburzeń węchowych. Inne stany, które mogą powodować zaburzenia węchu, obejmują choroby psychiczne, takie jak schizofrenia, depresja, epilepsja, a nawet zaburzenia endokrynologiczne (185). Izolowane zaburzenia smaku są rzadkie i mogą być spowodowane urazami głowy, infekcjami, zabiegami stomatologicznymi lub radioterapią,

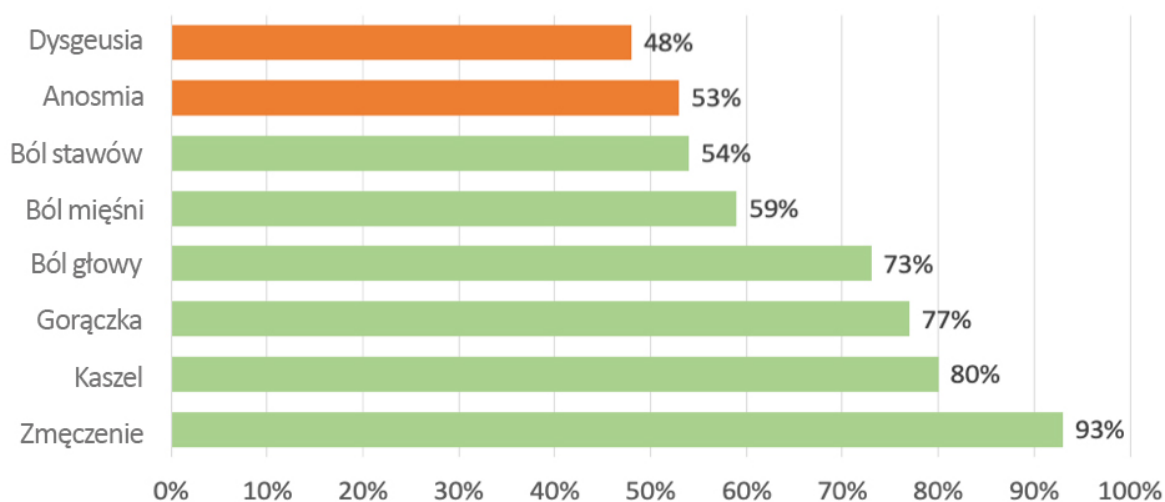
jednak najczęściej są spowodowane lekami. W wielu przypadkach urazów głowy całkowite wyleczenie następuje po kilku miesiącach. Zespół pieczenia w jamie ustnej (ang. burning mouth syndrome – BMS) charakteryzuje się gorzkim metalicznym smakiem i jest powszechny wśród kobiet po menopauzie. Cukrzyca i choroby wątroby także związane są z zaburzeniami smaku (186, 187).

4.7.2. Wirusowa dysfunkcja węchu (ang. post-viral olfactory dysfunction – PVOD)

Jeszcze przed pandemią COVID-19 zakażenia wirusowe łączono z zaburzeniami węchu a także smaku. Istnieje wiele podobieństw, lecz także kilka istotnych różnic między zaburzeniami węchu i smaku w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i innymi wirusami (PVOD) (188). Wirusowa dysfunkcja węchu charakteryzuje się nagłą zaburzeniami powonienia i/lub smaku po infekcji górnych dróg oddechowych z kilkunastoma zidentyfikowanymi wirusami powodującymi objawy przeziębienia. Najczęstszą grupą wirusów wywołujących zarówno objawy grypopodobne (189) jak i PVOD (190) są rinowirusy. Większość pacjentów zgłaszających powirusowe zaburzenia węchu zgłasza także zaburzenia smaku (191). Zaburzenia smaku w przebiegu PVOD jest jednak najprawdopodobniej wtórne do zaburzeń węchu, w przypadku wirusów innych niż SARS-CoV-2 (192). O różnych mechanizmach zaburzeń smaku i węchu może świadczyć chociażby praca Akerlund i wsp. (193) opisująca zaburzenia węchu, łącznie z całkowitą anosmią, w przebiegu zakażenia koronawirusem 229E. Symptodem tego zakażenia są m.i. objawy kataralne czy obstrukcja nosa, niebędące charakterystycznym objawem zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Do tej pory nie opisano dokładnego patomechanizmu zaburzeń smaku w PVOD. Przypuszczalnie, za te zaburzenia odpowiedzialne może być uszkodzenie nabłonka węchowego lub szlaków nerwowych. Nie wiadomo także, czy to wirusy bezpośrednio uszkadzają struktury węchowe, czy odpowiedzialny jest za to układ immunologiczny. W badaniach na modelu zwierzęcym iniekcja wirusa grypy typu A do opuszki węchowej prowadziła do wirusowego zapalenia mózgu oraz śmierci badanych zwierząt. Podanie wirusa donosowo prowadziło do obumarcia komórek węchowych, jednak nie skutkowało śmiercią zwierząt (194). Wysznuło więc teorię, że apoptoza komórek węchowych ma być mechanizmem protekcji ośrodkowego układu nerwowego przed zakażeniem wirusowym (195). POVD wykazuje zmienność sezonową. Z badań Konstantinidis i wsp. wynika, że szczytem zachorowań jest marzec oraz maj (196). Autorzy wiążą szczyty zachorowań z wysoką zachorowalnością na grypę w marcu oraz paragrypę w maju.

4.7.3. Zaburzenia smaku i węchu w COVID-19

W ostatnim czasie zauważono, że zaburzenia chemosensoryczne pod postacią anosmii (brak węchu) i ageusii (zaburzenia smaku), są wczesnymi objawami zakażenia wirusem SARS-CoV-2. WHO dodała brak węchu i zaburzenia smaku do listy oficjalnych objawów COVID-19 w kwietniu 2020 r. (197). W wielu badaniach monitorowano występowanie ageusii i anosmii u pacjentów z COVID-19. Większość z nich wykazała znaczną redukcję odczuwania smaku i zapachu u zakażonych pacjentów. W jednym z takich badań Klopfenstein i wsp. badali nagłe wystąpienie anosmii i ageusii u 70 pacjentów z dodatnim wynikiem SARS-CoV-2. Stwierdzono, że występowanie zaburzeń węchu wynosi 53%, a zaburzenia smaku 48% (198) (Rycina 1).



Rycina 1. Częstość występowania ageusii i anosmii w porównaniu do innych symptomów COVID-19. Na podstawie (198).

Badania pokazują, że zaburzenia chemosensoryczne w przebiegu COVID-19 mogą utrzymywać od 8 dni nawet do 8 tygodni (199, 200), przy czym u zdecydowanej większości pacjentów (do 85%) objawy chemosensoryczne ustępują wraz z pozostałymi objawami COVID-19 do 3 tygodni od zakażenia (201, 202).

Dokładna patofizjologia anosmii i zaburzeń smaku nie jest znana, ale podejrzewa się kilka mechanizmów mogących przyczynić się do omawianych zaburzeń. Wirus SARS-CoV-2 przenika do wnętrza komórek poprzez przyłączanie swoich białek S (ang. spike – kolec) do umieszczonych w błonie komórek gospodarza białek enzymu konwertującego

angiotensynę 2 (ang. angiotensin-converting enzyme 2 – ACE2). Fizjologiczną rolą enzymu ACE2 jest konwersja angiotensyny II w angiotensynę 1-7, która rozszerza naczynia krwionośne, ma działanie przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne i antyproliferacyjne (203). W procesie inwazji komórek gospodarza, poza ACE2, udział bierze także przezbłonowa proteaza serynowa 2 (ang. transmembrane serine protease 2 – TMPRSS2) oraz katepsyna L (204, 205). Najpierw wirus SARS-CoV-2 łączy się przez swoje białko S z białkiem ACE2 komórek gospodarza i wnika do komórki na drodze endocytozy. Następnie katepsyna L i TMPRSS2 tną enzymatycznie białko S, co umożliwia materiałowi genetycznemu wirusa wnikięcie do cytoplazmy gospodarza (206). Wiadomo, że białka ACE2 są obecne między innymi w ludzkich śliniankach. W związku z powyższym, infekcja może doprowadzić do ich dysfunkcji (207). Badania na zwierzętach wskazują, iż inny koronawirus- SARS-CoV-1 atakuje komórki ślinianek jako pierwsze w organizmie, zanim jego materiał genetyczny wykrywalny jest we krwi (208). Z kolei badania przeprowadzone na ludziach wskazują, że materiał genetyczny wirusa SARS-CoV-1 wykrywany jest w śliniankach, zanim dojdzie do pojawienia się jakichkolwiek zmian w płucach (209).

Inną możliwym mechanizmem ageusii z anosmią jest uszkodzenie drogi węchowej, co prowadzi do osłabienia lub utraty węchu i smaku. Podejrzewa się, że dochodzi do uszkodzenia nieneuronalnych komórek nabłonka węchowego. Mało prawdopodobna wydaje się zaś infekcja komórek neuronalnych, gdyż skutkowałoby to występowaniem innych objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego. Nowsze badania MRI przeprowadzone między innymi przez Laundon i wsp. (210), Politi i wsp. (211) czy Brann i wsp. (212) dowodzą obecności przejściowych zmian w opuszce węchowej w przebiegu anosmii w COVID-19. Mechanizm tych zmian związany jest jednak z infekcją przez wirusa komórek pericytów naczyniowych opuszki węchowej. W badaniach eksperymentalnych wykazano wysoką aktywność receptorów koronawirusa ACE2 właśnie w pericytach naczyń opuszki węchowej (212) lecz także w komórkach glejowych (213), neuronach odpowiedzialnych za regulację układu sercowo-naczyniowego w pniu mózgu czy neuronów niezwiązanych z układem sercowo-naczyniowym, zlokalizowanych w korze ruchowej czy jądrach szwu (214). Receptory ACE2 obecne są także w innych narządach takich jak serce, nerki, jelita (215-218). W neuronach opuszki u myszy nie zaobserwowano ekspresji białek ACE2 (212) ani komórek wykazujących ekspresję ACE2 w trakcie sekwencjonowania RNA jednokomórkowego (ang. single-cell RNA sequencing – scSeq) u człowieka w korze przedczołowej i hipokampie (219). Prawdopodobnie zaś mechanizm zaburzeń struktury opuszki węchowej,

związany z infekcją wirusem SARS-CoV-2 polega na zaburzeniach perfuzji i reakcji zapalnej w obrębie opuszki węchowej spowodowany wnikaniem wirusa do perycytów opuszki węchowej. Perycyty są kluczową strukturą bariery krew-mózg i biorą udział w modulowaniu odpowiedzi zapalnej (220). Niezależnie jednak od powyższych rozważań Moriguchi i wsp (221) w opublikowanym opisie przypadku potwierdzili obecność SARS-CoV-2 w płynie mózgowo-rdzeniowym poprzez sekwencjonowanie genetyczne.

Istnieją też doniesienia naukowe sugerujące neuroinwazyjny charakter wirusa SARS-CoV-2 (222-225). Wcześniej opisywano wpływ infekcji wirusowych na patologie układu nerwowego takie jak zapalenie mózgu, toksyczną encefalopatię czy ostre zmiany demielinizacyjne rozwijające się po infekcjach wirusowych (226, 227). Udowodniono także, że niektóre wirusy mają zdolność infekcji OUN (228, 229).

Badania na modelach zwierzęcych wykazywały w przeszłości zdolność wirusów do uszkodzania dróg węchowych i innych regionów w mózgu (230, 231). Biorąc jednak pod uwagę fakt, iż zaburzenia smaku i węchu ustępują u większości pacjentów COVID-19 stosunkowo szybko, należy zgodzić się z argumentacją Vaira i wsp. że mało prawdopodobnym jest mechanizm ageusii i anosmii polegający na uszkodzeniu komórek nerwowych, bardziej prawdopodobnym zaś patologia innych rodzajów komórek (232).

Jeszcze innym potencjalnym patomechanizmem zaburzeń smaku w wyniku zakażenia wirusem SARS-CoV-2 jest zapalenie błony śluzowej jamy ustnej, znanej z silnej ekspresji receptorów ACE2. Wirus SARS-CoV-2 wnika do komórek gospodarza poprzez wiązanie z receptorem ACE2 wywołując jego regulację w dół (ang. down-regulation) (204). Prowadzi to do zwiększonego poziomu bradykininy (BK) i des-Arg9-bradykininy. Wiele symptomów obserwowanych w COVID-19, takich jak suchy kaszel, stan zapalny, ból, rozszerzenie naczyń i zwiększona przepuszczalność naczyń może być związanych właśnie ze zwiększonym poziomem tych kinin.

Sformułowano także teorie dotyczące zaburzeń smaku związanych z zaburzeniem gospodarki cynkiem. Odpowiedź immunologiczna na replikację wirusa SARS-CoV-2 może prowadzić do zmian w komórkowej homeostazie cynku w komórkach smakowych jamy ustnej, co skutkować może hipogeusią, a nawet ageusią (233). W przypadku wirusa SARS, będącego strukturalnie bardzo podobnym do SARS-CoV-2, stwierdzono, że komórki nabłonka

wyściełające przewody gruczołów ślinowych są jednym z pierwszych miejsc inwazji wirusa (208). Prowadzi to do zmniejszonego wydzielania śliny, co może zaburzać odczuwanie smaków (234). Wydzielanie to może być zmniejszone także z powodu niedoboru cynku (235). Dodatkowo istnieją dowody, iż zaburzenia białka wiążącego cynk – gustyny, wiązane są z nieprawidłowościami w budowie kubków smakowych (236). Dodatkowo część badaczy podkreśla, że zaburzenia smaku mogą być spowodowane lekami zażywanyymi w związku z infekcją SARS-CoV-2, a nie samą infekcją (237).

Mehraeen i wsp. przeprowadzili metaanalizę piśmiennictwa do której włączyli 24 badania z całego świata, w których zebrano dane dotyczące utraty zapachu i smaku w przebiegu COVID-19. Spośród analizowanych prac, w 95% z nich (n=23) stwierdzono występowanie anosmii i ageusii w populacji pacjentów chorych na COVID-19. Autorzy metaanalizy wskazują, że prawdopodobną przyczyną tych zaburzeń jest reakcja zapalna wywoływana przez wirusa SARS-CoV-2 w nerwie węchowym (238).

W innym badaniu retrospektywnym przeprowadzono wywiady telefoniczne z 204 osobami u których zdiagnozowano zakażenie wirusem SARS-CoV-2. U 55,4% z nich stwierdzono osłabienie odczuwania zapachów, u 41,7% osłabienie odczuwania smaków, a u 40,2% pacjentów występowanie obu tych zaburzeń. Stwierdzono, że zaburzenia smaku i węchu w przebiegu COVID-19 występują częściej u kobiet niż u mężczyzn (239).

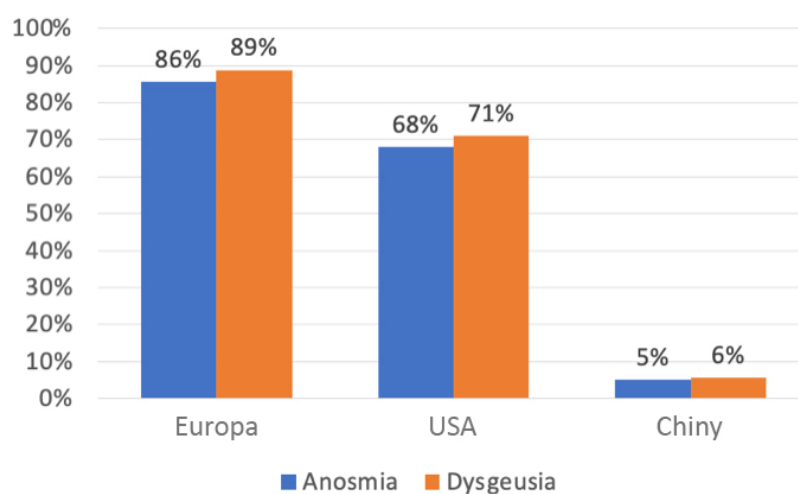
W jeszcze innym badaniu przeprowadzonym w trybie ambulatoryjnym na 64 pacjentach COVID-19, prawie 3 na 5 osób zgłosiło utratę węchu/smaku pomimo braku innych objawów lub łagodnej manifestacji ze strony układu oddechowego. Wyniki wskazują, iż ageusia oraz anosmia mogą silnie korelować z zakażeniem pacjenta wirusem SARS-CoV-2, pomimo braku innych objawów klinicznych (240).

W opublikowanej analizie systemowej wykryto bardzo silny związek między brakiem węchu a zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 (u około 1 na 5 pacjentów). Ta sama analiza wykazała również istotny związek między zaburzeniami smaku a obecnością tego wirusa. Okazało się, że wielu pacjentów, którzy zgłaszali brak węchu, również zgłaszało zaburzenia smaku (241). Tong i wsp. dokonali metaanalizy prac dotyczących zaburzeń smaku i węchu w COVID-19. Dodatkowo ocenili także jakość zastosowanych narzędzi badawczych w analizowanych pracach. Autorzy wykazali, że częstość występowania ageusii to 43.93%

(na podstawie danych z 9 prac, w których łącznie zaburzenia smaku prezentowało 629 spośród 1390 pacjentów COVID-19). Co ciekawe, autorzy przeanalizowali występowanie anosmii w podgrupie badań o wysokiej jakości metod badawczych (metody zwalidowane) w stosunku do badań o niezwalidowanych metodach badawczych. W pierwszej grupie częstość występowania zaburzeń węchu wyniosła 86,06% w stosunku do zaledwie 36,64% w drugiej grupie.

W kolejnym badaniu przeprowadzonym na 128 osobach, spośród których 64 chorowały na COVID-19 a 64 osób stanowiło grupę kontrolną, stwierdzono, że anosmia i zaburzenia smaku były siedmiokrotnie częstsze w grupie badanej, w porównaniu do grupy kontrolnej. Co istotne, 26,6% pacjentów, w grupie badanej, zgłosiło brak węchu/ smaku jako pierwszy objaw choroby COVID-19, 73% zgłosiło wystąpienie anosmii/ageusii przed badaniem na obecność COVID-19, a 85% z nich zgłosiło poprawę węchu/ smaku w ciągu pierwszych 10 dni od ich wystąpienia (242).

Wstępne raporty i badania wskazują na różnice między krajami azjatyckimi a Europą i USA w rozpowszechnieniu zaburzeń smaku i węchu w populacji pacjentów COVID-19. Wydaje się, że zaburzenia te są mniej nasilone w Azji (zwłaszcza w Chinach) w porównaniu z krajami europejskimi i USA (Rycina 2), choć przyczyna tych różnic epidemiologicznych pozostaje nieznana. Można ich jednak dopatrywać się w różnicach szczepów wirusa SARS-CoV-2 lub różnicach genetycznych w populacjach omawianych regionów (243).



Rycina 2. Rozpowszechnienie zaburzeń smaku i zapachu u pacjentów COVID-19 w zależności od regionu świata. Na podstawie (243).

Ze znakomitej większości opublikowanych dotychczas badań wynika, że zaburzenia smaku i węchu w przebiegu COVID-19 wydają się być bardzo istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego. Nawet bezobjawowi pacjenci, u których wykryto COVID-19, zgłaszali pewien stopień zaburzenia smaku i węchu. Objawy te wydają się być istotne w kontekście przyszłych badań epidemiologicznych i mogą pomóc w śledzeniu rozprzestrzeniania się infekcji SARS-CoV-2.

4.8. Doniesienia o aktualnym wykorzystaniu zaburzeń smaku i węchu w diagnostyce COVID-19

Dopiero od niedawna naukowcy zaczęli dostrzegać wartość diagnostyczną zaburzeń smaku i węchu u chorych COVID-19. Co ciekawe i warte podkreślenia, zaburzenia te są jednymi z pierwszych i często jedynych objawów zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Fakt ten może stanowić podstawę do szybkiej diagnostyki na szeroką skalę i skutecznego zarządzania zdrowiem publicznym. We Francji przeprowadzono badanie obejmujące 217 pacjentów, którzy zgłaszali się jako pacjenci ambulatoryjni z podejrzeniem zakażenia COVID-19. U 77% osób zgłaszających anosmię lub zaburzenia smaku oraz 83% zgłaszających oba te zaburzenia, stwierdzono pozytywny wynik testu na obecność wirusa SARS-CoV-2 w badaniu RT-PCR (244). Wyniki te, jeżeli zostaną potwierdzone w dalszych badaniach, zdają się być bardzo obiecujące, w kontekście wykorzystania oceny zaburzeń smaku i węchu do badania przesiewowego zakażenia wirusem SARS-CoV-2.

Z drugiej strony doniesienia naukowe wskazują na potencjalnie wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych, w wykrywaniu zakażenia SARS-CoV-2, w teście PCR (245). Wynika to głównie z faktu, że często wirus nie jest wykrywany w RT-PCR na bardzo wczesnych etapach infekcji, w wymazie z nosogardła. W takich przypadkach, jeśli u pacjentów występują zaburzenia węchu lub smaku lub oba te objawy, można ich uznać za potencjalnie zakażonych, dopóki nie zostanie udowodnione, że jest inaczej i powtórnych testach PCR.

Zaburzenia węchu i smaku mogą odgrywać kluczową rolę w rozróżnianiu zakażenia wirusem grypy od wirusa SARS-CoV-2. Zwykle utrata węchu lub smaku nie jest objawem grypy. Wiedza ta może być kluczowym czynnikiem różnicującym, jeśli, zgodnie z opiniami części ekspertów, SARS-CoV-2 ma stać się wirusem sezonowym, jak wirus grypy.

To zróżnicowanie staje się również ważne na oddziałach ratunkowych (SOR) i placówkach służby zdrowia, ponieważ jest to pierwszy i łatwy objaw odróżniający gripę od COVID-19. Jak wykazało badanie przeprowadzone w Nowym Jorku, tylko 34% wszystkich pacjentów, którzy zgłosili się z zaburzeniem węchu, smaku lub obydwoma, zostało przebadanych pod kątem COVID-19 i aż 72% z nich okazało się pozytywnych. Spośród pacjentów z dodatnim wynikiem testu na SARS-CoV-2 tylko 52% pacjentów zostało przebadanych w kierunku COVID-19 podczas pierwszej wizyty na SOR. Biorąc pod uwagę tak wysoką pozytywną wartość predykcyjną, tym ważniejsze zdaje się być szybka identyfikacja zaburzeń smaku i węchu, jako objawów klinicznych zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (246).

5. CELE PRACY

W chwili obecnej diagnoza COVID-19 opiera się głównie na testach RT-PCR. Jednak tego typu zaawansowana diagnostyka nie zawsze jest łatwo dostępna, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Także rozwinięte systemy medyczne, w momentach zwiększonej liczby zakażeń borykają się z problemem opóźnionej diagnostyki co przekłada się na właściwą kwarantannę pacjentów. Od wybuchu pandemii wiele doniesień opisywało objawy kliniczne pacjentów z COVID-19. Biorąc pod uwagę ograniczone zasoby kliniczne, ważne jest, aby zidentyfikować patognomonicznej objawy zakażenia COVID-19, aby poprzez terminową kwarantannę pacjentów, zahamować rozprzestrzenianie się choroby. Wiele dotychczasowych prac wskazuje na pojawianie się zaburzeń smaku i węchu u pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2, które to dysfunkcje nie były obecne przed kontaktem z tym patogenem. Przedmiotem badań niniejszej pracy jest dokładna ocena zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19, ze szczególnym uwzględnieniem typu zaburzeń poszczególnych smaków. Zgodnie z doniesieniami naukowymi, charakter zaburzeń smaku w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 jest unikalny w stosunku do innych zakażeń wirusowych. Dokładne scharakteryzowanie tych zaburzeń pozwoli z kolei na stworzenie modelu predykcyjnego zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Model taki pod postacią testu przesiewowego mógłby być hipotetycznie wykorzystywany w populacji ogólnej do szybkich badań i identyfikacji osób z grup podwyższonego ryzyka zakażenia.

Cele pracy to:

1. Ocena charakterystyki zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19, z uwzględnieniem zaburzeń poszczególnych smaków.
2. Stworzenie modelu predykcyjnego zakażenia wirusem SARS-CoV-2 bazującego na obiektywnych testach smaku.
3. Porównanie skuteczności modeli predykcyjnych bazujących na subiektywnych symptomach COVID-19 z modelami bazującymi na obiektywnych testach smaku.

6. MATERIAŁ I METODY

6.1. Opis ogólny materiału i metody zastosowanej w pracy

Niniejsza praca składa się z dwóch faz.

1. Faza pilotażowa badania przeprowadzona została na 25 młodych, zdrowych dorosłych mężczyznach, bez chorób współistniejących, u których wynik testu PCR wymazu z jamy nosowo-gardłowej na obecność SARS-CoV-2 dał wynik ujemny. Głównym celem było ustalenie odczuwania progów smakowych wśród zdrowej populacji.
2. Faza główna badania przeprowadzona została na 88 osobach (szczegółowe dane dotyczące uczestników badania przedstawiono w tabeli 3 na str. 48). Głównym celem było porównanie odczuwania smaków w grupie badanej (52 osoby – wynik SARS-CoV-2 dodatni) i grupie kontrolnej (37 osób – wynik SARS-CoV-2 ujemny).

Badanie uzyskało akceptację właściwej Komisji Etyki Centralnego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie (decyzja nr 82/2020) i zostało przeprowadzone zgodnie z dobrą praktyką kliniczną oraz normami etycznymi określonymi w Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku wraz z późniejszymi zmianami. Badania nie były finansowane ze źródeł zewnętrznych. Od uczestników uzyskano świadome, pisemne zgody na udział w badaniu.

6.2.1. Opis szczegółowy fazy pilotażowej mającej na celu określenie stężeń substancji smakowych testowanych w fazie głównej

Celem tej fazy badania było wybranie stężeń substancji smakowych do wykorzystania w fazie głównej, z udziałem pacjentów COVID-19. Fazę pilotażową przeprowadzono, aby skrócić czas ekspozycji badaczy na wirusa i zapewnić, że zastosowano wcześniej zwalidowane stężenia substancji smakowych. Zdecydowano, o wyborze najniższego stężenia substancji smakowej, odczuwalnej dla minimum 90% badanych, zdrowych osób. Niższe stężenia odrzucono, tak samo jak stężenia, które okazały się być bodźcami supramaksymalnymi, nierozróżnianymi przez 90% badanych od niższych stężeń substancji smakowych.

Tak ustalono najniższe, pośrednie i najwyższe stężenia substancji smakowych do badania głównego.

Badanie pilotażowe przeprowadzono w kwietniu 2020 roku na 25 młodych, zdrowych dorosłych mężczyznach (grupa zbliżona do populacji uczestników badania fazy głównej), których średnia wieku wynosiła 21,2 lat (min. 19, maks. 26) bez współistniejących chorób, u których test na obecność wirusa SARS-CoV-2 dał wynik ujemny (w badaniu RT-PCR wymazów z jamy nosowo-gardłowej). Każdy uczestnik otrzymał 20 żelatynowych tabletek smakowych (pięć różnych stężeń w czterech smakach: kwaśnym, słodkim, słonym i gorzkim) które mógł próbować w dowolnej kolejności. Uczestnicy zostali poinstruowani, aby przepłukać usta wodą przed przystąpieniem do badania, a po umieszczeniu tabletki smakowej w ustach poczekać, aż ta rozpuści się i dopiero wtedy opisać odczuwany smak. Uczestnicy nie wiedzieli jaki jest smak tabletek, które otrzymali. Każdy uczestnik został poproszony o określenie smaku i jego intensywności w skali od 1 do 5 dla każdej tabletki. Jeżeli użytkownik nie był w stanie określić smaku tabletki bądź określił go błędnie- odpowiedzi przypisywano wartość 0.

Jako nośnik (wypełniacz) tabletek smakowych zastosowano wodę. Po rozpuszczeniu w niej substancji smakowej, dodawano żelatynę i agar (w stosunku 1:1), aby umożliwić formowanie tabletek. Każda tabletki miała identyczną objętość. Tabletki zawierały różne substancje smakowe w następujących stężeniach:

- Pięć stężeń kwaśnego smaku (kwas askorbinowy): 3,125; 6,25; 12,5; 18,75; 25 mg/ml,
- Pięć stężeń słodkiego smaku (sacharoza): 20; 40; 60; 80; 106,4 mg/ml,
- Pięć stężeń o słonym smaku (chlorek sodu): 7,75; 13,5; 17; 27; 34,75 mg/ml,
- Pięć stężeń gorzkiego smaku (wyciąg z grejpfruta – 99% naringina): 20; 30; 40; 50; 60 mg/ml.

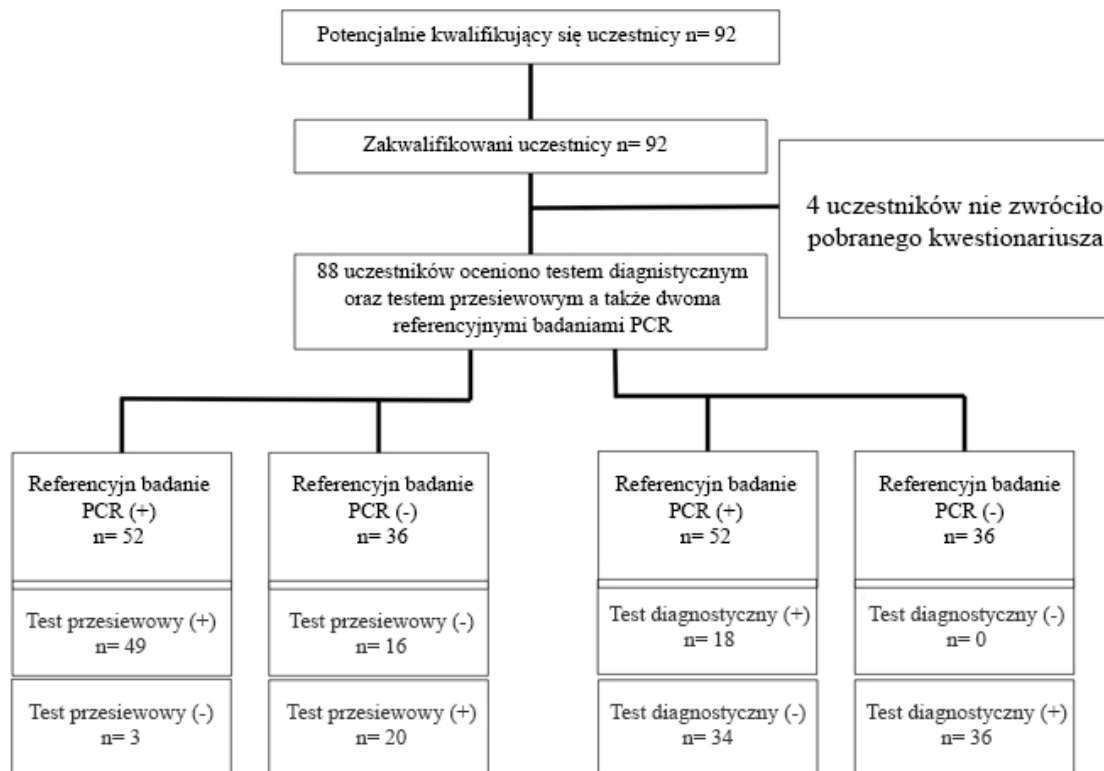
Każda tabletki smakowa miała objętość 0,33 ml i była umieszczona w osobnym foliowym woreczku, wraz z oznaczeniem jej numeru.

Po przeprowadzeniu badania pilotażowego i wybraniu ostatecznych stężeń substancji smakowych, do fazy głównej badania wybrano 9 testerów (tabletek) smakowych, opisanych w podrozdziale 8.1, wraz z tabletką bezsmakową.

6.2.2. Opis szczegółowy fazy głównej badania, mającej na celu ocenę występowania zaburzeń smaku w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2.

Fazę główną badania przeprowadzono od kwietnia do maja 2020 roku na 92 studentach Szkoły Głównej Służby Pożarniczej w Warszawie (SGSP) mieszkających w akademiku, którzy spełnili kryteria włączenia (potwierdzona infekcja SARS-CoV-2, wiek powyżej 18 lat, wyrażenie świadomej zgody) i wykluczenia (zaburzenia węchu i smaku trwające ponad trzy miesiące od dnia badania, wszelkie choroby neurologiczne, choroby lub czynniki, które w opinii badacza mogą wpływać na wyniki testów). Po wykryciu ogniska epidemii koronawirusa SARS-CoV-2 w SGSP, studenci mieszkający razem w akademiku zostali przebadani pod kątem zakażenia koronawirusem za pomocą testu RT-PCR wymazu z jamy nosowo-gardłowej. Studenci z pozytywnym wynikiem testu zostali przeniesieni do izolatorium w specjalnie przystosowanym do tego hotelu. Studenci, którzy uzyskali wynik negatywny, zostali umieszczeni w oddzielnych pokojach w akademiku.

Czterech z 92 studentów nie zwróciło kwestionariusza badania. Spośród pozostałych 88 osób, 51 zostało włączonych do grupy badanej (wszyscy pacjenci z pozytywnym wynikiem SARS-CoV-2), a 37 do grupy kontrolnej (Rycina 3). W dniu badania u każdego studenta wykonano dodatkowy test PCR w celu potwierdzenia zakażenia SARS-CoV-2. W czasie zbierania danych badacze znali jedynie wyniki pierwszego testu PCR, ale nie znali zaś drugiego. Tylko jedna osoba z grupy kontrolnej po ponownym badaniu uzyskała pozytywny wynik testu SARS-CoV-2. Wynik ten potwierdzono kolejnym testem PCR, a uczestnika przeniesiono do grupy badanej (ostateczna liczba uczestników w grupie kontrolnej wyniosła zatem 36, a w grupie badanej 52). Testy RT-PCR przeprowadzono w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego - Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie. Zastosowano zestaw GeneFinder COVID-19 PLUS RealAmp do wykrywania genów RdRp, E i N, z czułością 10 kopii genów i punktem odcięcia ≤ 43 cykli dla wyniku pozytywnego. Osoby oceniające testy PCR nie posiadały żadnych informacji klinicznych dotyczących uczestników ani wyników testów smaku.



Rycina 3. Schemat badania i wyniki prognostyczne modeli pochodnych (testu przesiewowego oraz testu diagnostycznego) post-hoc (patrz tabela 6).

Adnotacja. Brak niejednoznacznych wyników testów. Referencyjny badanie PCR (+) – pozytywny wynik próby – wykryto materiał SARS-CoV-2; referencyjny PCR (-) – próbka negatywna – nie wykryto materiału SARS-CoV-2; test przesiewowy (+) dodatni – wynik testu sugeruje zakażenie wirusem SARS-CoV-2 jeżeli u pacjenta wystąpił którykolwiek z objawów (subiektywne zaburzenie węchu w ciągu ostatniego miesiąca, subiektywne zaburzenie smaku w ciągu ostatniego miesiąca, wystąpienie gorączki w ciągu ostatniego miesiąca) lub pacjent błędnie zidentyfikował tester Słodki 1; test diagnostyczny (+) dodatni – wynik testu wskazuje na bardzo wysokie ryzyko zakażenia wirusem SARS-CoV-2 jeżeli pacjent błędnie zidentyfikował którykolwiek tester: Słony 1, Słony 2 lub Słony 3; test przesiewowy/diagnostyczny (-) ujemny wynik sugeruje brak zakażenia SARS-CoV-2.

U wszystkich badanych przeprowadzono pełną ocenę czterech smaków. Każdy uczestnik otrzymał dziewięć tabletek smakowych i jedną bezsmakową referencję (proces selekcji 9 tabletek do fazy głównej spośród 21 tabletek smakowych w fazie pilotażowej opisano w podrozdziale 8.1). Tabletki smakowe same w fazie pilotażowej i fazie głównej były przygotowane w ten sam, identyczny sposób, opisany w podrozdziale 6.2.1. Ani pacjenci,

ani badacze nie znali smaków poszczególnych tabletek. Pacjenci zostali poinstruowani, aby przepłukać usta wodą i rozpocząć badanie z wyraźnie oznaczoną próbką bezsmakową, a następnie ocenić próbki smakowe (w dowolnej kolejności). Uczestnicy zostali poinstruowani, aby poczekać, aż kapsułka rozpuści się w ustach, a następnie opisać odczuwany smak na formularzu. Przed ocenieniem kolejnej tabletki, studenci zostali poinstruowani, aby przepłukiwać usta i język wodą, a następnie odczekać 60 sekund. Podczas badania nie wystąpiły żadne zdarzenia niepożądane.

7. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu PQStat w wersji 1.8.0.392 i IBM SPSS Statistic w wersji 21. Ponieważ przetestowano całą dostępną populację studentów, nie przeprowadzono obliczenia minimalnej wielkości próby w badaniu.

W analizie statystycznej nie było wyników nieokreślonych ani brakujących wartości. Statystyki opisowe dla zmiennych ilościowych podano jako średnią \pm SD. Analizę pytań kwestionariuszowych pomiędzy podgrupami populacji przeprowadzono za pomocą dokładnego testu Fishera dwustronnego. Analizę statystyczną różnych dysfunkcji smakowych przeprowadzono za pomocą dokładnego testu Fishera jednostronnego- w przypadku testów smakowych hipoteza badawcza sformułowana była jednostronnie, ponieważ wszystkie wcześniejsze badania opisane w literaturze wskazują na pogorszenie odczuwania smaków w przebiegu COVID-19.

Korzystając z wyniku testów smaku oraz pytań kwestionariuszowych, przeprowadzono analizę dla każdego pojedynczego istotnego testu smaku oraz kombinacji testów smaku i pytań kwestionariuszowych, aby określić ich czułość = $[\text{prawdziwie dodatnie}/(\text{prawdziwie dodatnie} + \text{fałszywie ujemne})]$, swoistość = $[\text{prawdziwie ujemne}/(\text{prawdziwie ujemne} + \text{fałszywie dodatnie})]$, dodatnią wartość prognostyczną = $[\text{prawdziwie dodatnie} / \text{prawdziwie dodatnie} + \text{fałszywie dodatnie}]$ oraz ujemną wartość prognostyczną = $[\text{prawdziwie ujemne} / (\text{prawdziwie ujemne} + \text{fałszywie ujemne})]$. Poziom istotności statystycznej ustalono na $p \leq 0,05$ z 95% przedziałem ufności. Diagnostyczny przedział ufności (czułość, swoistość i wartości predykcyjne) obliczono, obliczając 95% przedziały ufności metodą Cloppera-Pearsona dla jednej proporcji.

Krzywe charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC) zostały stworzone w celu oceny wydajności predyktora po wybraniu odpowiednich klasyfikatorów objawów w oparciu o model regresji i użyteczność kliniczną. Przeprowadzono analizę obszaru pod krzywą ROC (AUC), aby ocenić zdolność klasyfikatorów objawów i testerów smaku do odróżnienia osób zakażonych COVID-19 od osób z ujemnym wynikiem COVID19. Istotność statystyczną ustalono na wartość $p \leq 0,05$ dla wszystkich analiz. Praca została przygotowana zgodnie ze standardami raportowania badań dokładności diagnostycznej (STARD 2).

8. OPIS WYNIKÓW BADAŃ

8.1. Faza Pilotażowa

Podczas badania pilotażowego zaobserwowano trudności w identyfikacji i rozróżnianiu intensywności gorzkiego smaku, który często mylono ze smakiem słonym. W oparciu o tę tezę zdecydowano się odrzucić wartość diagnostyczną różnych stężeń smaku gorzkiego odczuwanego przez minimum 90% badanych (23 z 25 uczestników badania), pozostawiając jedynie tester z najniższym odczuwanym stężeniem gorzkiej substancji. W oparciu o tezę, że pacjenci z COVID-19 mają podwyższone progi odczuwania smaku w porównaniu z osobą zdrową i chcąc ograniczyć czas ekspozycji badaczy na kontakt z pacjentami COVID-19, a także skrócić czas pojedynczego testu - zdecydowano się odrzucić najsłabsze stężenia tabletek smakowych i wybrać te które były rozpoznawane przez minimum 90% badanych. Analogicznie odrzucono testery których wyższego stężenia substancji smakowej w stosunku do bezpośredniego testera o niższym stężeniu nie rozpoznało (poprzez wyższą punktację w skali intensywności smaku) co najmniej 90% badanych.

Ostatecznie, w oparciu o powyższe kryteria, z zestawu omówionych wcześniej tabletek smakowych, wybrano te najwyższych wartościach diagnostycznych, wraz z nazwami nadanymi tabletkom smakowym:

1. Smak kwaśny (kwas askorbinowy):
 - a. Kwaśny 1 – 6,25 mg/ml,
 - b. Kwaśny 2 – 12,5 mg/ml,
2. Smak słodki (sacharoza):
 - a. Słodki 1 – 40 mg/ml,
 - b. Słodki 2 – 80 mg/ml,
 - c. Słodki 3 – 106,4 mg/ml,
3. Słony (chlorek sodu):
 - a. Słony 1 – 13,5 mg/ml,
 - b. Słony 2 – 17 mg/ml,
 - c. Słony 3 – 27 mg/ml,

4. Gorzki (wyciąg z grejpfruta – 99% naringina):

a. Gorzki 1 – 40 mg/ml.

8.2. Faza główna

8.2.1. Objawy podmiotowe uczestników badania

Charakterystykę pacjentów z grupy badanej oraz grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 3. Populację pacjentów stanowiło 88 osób, 84 mężczyzn i 4 kobiety. W grupie badanej, zakażonej wirusem SARS-CoV-2, znajdowało się 52 osoby, w grupie kontrolnej – 36 osoby. Pacjenci z obydwu grup nie różnili się od siebie pod względem wieku, wzrostu i masy ciała. Średnia wieku dla grupy badanej wyniosła 21,7 lat, dla grupy kontrolnej – 20,8 lat. Nie wykazano istotnych różnic w liczebności osób palących papierosy i e-papierosy w obu grupach. Dla objawów takich jak: gorączka w dniu badania, kaszel w ciągu ostatniego miesiąca, katar w ciągu ostatniego miesiąca oraz duszność w ciągu ostatniego miesiąca, wykazano numeryczne różnice w rozkładzie odpowiedzi, jednak były one nieistotne statystycznie.

Tabela 3. Dane demograficzne oraz objawy podmiotowe uczestników badania.

Parametr	Grupa badana SARS-CoV-2 (+) (n=52). Wartość średnia (min; max).	Grupa kontrolna SARS-CoV-2 (-) (n=36). Wartość średnia (min; max).
Wiek [lata]	21,7 (19; 26)	20,8 (19; 24)
Płeć męska [n]	51	34
Wzrost (cm)	181 (170; 198)	181 (170; 197)
Waga (kg)	78,5 (60; 112)	78,5 (62; 93)
Czas od pierwszego pozytywnego wyniku PCR [dni]	5 (1; 8)	BD
Oznaki i objawy [ostatnie 30 dni]:		
Gorączka [n]	21*	2
Kaszel [n]	15	5
Duszność [n]	8	1
Katar	22	13
Tradycyjni palacze (obecnie)	4	7
Palacze e- papierosów	3	1
Subiektywne zaburzenia węchu	25*	3
Subiektywne zaburzenia smaku	32*	2

Adnotacja. BD- brak danych.

* - istotność statystyczna w dokładnym teście Fishera dwustronnym $p < 0,001$.

W tabeli 4 i 5 przedstawiono porównanie wybranych objawów przedmiotowych w grupie badanej oraz grupie kontrolnej. Najczęstszym objawem przedmiotowym w badanej populacji był katar, obecny u 35 uczestników badania (40,7% badanych), jednak objaw ten nie był istotny statystycznie przy ocenie zakażenia wirusem SARS-CoV-2.

Najczęstszymi objawami przedmiotowymi w grupie osób zakażonych wirusem SARS-CoV-2 były: subiektywne zaburzenia smaku występujące u 61,5% osób z grupy badanej, subiektywne zaburzenia węchu – 48%, katar – 43% i gorączka w ciągu ostatniego miesiąca – 40%. Spośród powyższych objawów, w badanej populacji istotnymi statystycznie ($p < 0,05$) okazały się 3 objawy: subiektywne zaburzenie smaku w ciągu ostatniego miesiąca, subiektywne zaburzenie węchu w ciągu ostatniego miesiąca, gorączka w ciągu ostatniego miesiąca.

Zaburzenia smaku w przebiegu ostatniego miesiąca, był najczęstszym objawem zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w grupie badanej – wykazały go 32 osoby zakażone, co stanowiło 61,5% grupy badanej. Spośród osób raportujących zaburzenia smaku, jedynie 2 spośród 34 uczestników badania z obu grup, raportujących subiektywne zaburzenia smaku (co stanowiło 5,6% tej grupy), fałszywie dodatnio wykazało na ten objaw.

Kolejnym co do liczności, istotnym statystycznie objawem zakażenia koronawirusem, w grupie badanej były subiektywne zaburzenia węchu – 28 osób zakażonych (31,8% grupy badanej). Objaw ten wykazały 3 osoby z grupy kontrolnej (8,3% wyników fałszywie dodatnich).

Najmniej licznym objawem istotnym statystycznie była gorączka w przebiegu ostatniego miesiąca – objaw ten wykazało 21 osób z grupy badanej (40,4% tej grupy). Dwie osoby z grupy kontrolnej zaraportowały ten objaw (5,6% wyników fałszywie dodatnich).

Tabela 4. Porównanie znamienne statystycznych objawów przedmiotowych zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.

Obj. przedm.	Obecność obj. przedm.	Proporcja	Grupa kontrolna SARS-CoV-2 (-)	Grupa badana SARS-CoV-2 (+)	Ogółem	p
Subiektywne zaburzenia węchu w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	33	27	60	0,001
		% z obj. przedm.	55,0%	45,0%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	91,7%	51,9%	68,2%	
	TAK	Liczebność	3	25	28	
		% z objaw przedmiot.	10,7%	89,3%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	8,3%	48,1%	31,8%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z objaw przedmiot.	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Subiektywne zaburzenia smaku w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	34	20	54	0,001
		% z objaw przedmiot.	63,0%	37,0	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	94,4%	38,5%	61,4%	
	TAK	Liczebność	2	32	34	
		% z objaw przedmiot.	5,9%	94,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	5,6%	61,5%	38,6%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z objaw przedmiot.	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Gorączka w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	34	31	65	0,001
		% z objaw przedmiot.	52,3%	47,7%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	94,4%	59,6%	73,9%	
	TAK	Liczebność	2	21	23	
		% z objaw przedmiot.	8,7%	91,3%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	5,6%	40,4%	26,1%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z objaw przedmiot.	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	

Adnotacja. Obj. przedm. – objaw przedmiotowy; Obecność obj. przedm. – obecność objawu przedmiotowego.

Tabela 5. Porównanie wybranych, nieznamiennych statystycznie, objawów przedmiotowych zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.

Obj. przedm.	Obecność obj. przedm.	Proporcja	Grupa kontrolna SARS-CoV-2 (-)	Grupa badana SARS-CoV-2 (+)	Ogółem	p
Gorączka w dniu badania	NIE	Liczebność	29	37	66	0,192
		% z objaw przedmiot.	43,9%	56,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	85,3%	71,2%	76,7%	
	TAK	Liczebność	15	5	20	
		% z objaw przedmiot.	25%	75%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	14,7%	28,8%	23,3%	
	Ogółem	Liczebność	34	52	86	
		% z objaw przedmiot.	39,5%	60,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Kaszel w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	29	37	66	0,192
		% z objaw przedmiot.	43,9%	56,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	85,3%	71,2%	76,7%	
	TAK	Liczebność	5	15	20	
		% z objaw przedmiot.	25%	75%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	14,7%	28,8%	23,3%	
	Ogółem	Liczebność	34	52	86	
		% z objaw przedmiot.	39,5%	60,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Katar w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	21	30	51	0,823
		% z objaw przedmiot.	41,2%	58,8%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	61,8%	57,7%	59,3%	
	TAK	Liczebność	13	22	35	
		% z objaw przedmiot.	37,1%	62,9%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	38,2%	42,4%	40,7%	
	Ogółem	Liczebność	34	52	86	
		% z objaw przedmiot.	39,5%	60,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Duszność w ciągu ostatniego miesiąca	NIE	Liczebność	33	44	77	0,081
		% z objaw przedmiot.	42,9%	57,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	97,1%	84,6%	89,5%	
	TAK	Liczebność	1	8	9	
		% z objaw przedmiot.	11,1%	88,9%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	2,9%	15,4%	10,5%	
	Ogółem	Liczebność	34	52	86	
		% z objaw przedmiot.	39,5%	60,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	

Adnotacja. Obj. przedm. – objaw przedmiotowy; Obecność obj. przedm. – obecność objawu przedmiotowego.

8.2.2. Zaburzenia smaków stwierdzone obiektywnymi testami

W badanej populacji testerami smaku których identyfikacja różniła się w sposób istotny statystycznie między grupą badaną i grupą kontrolną były testery: Słodki 1, Słodki 3, Słony 1 oraz Słony 2. Dla pozostałych testerów wykazano numeryczne różnice w rozkładzie odpowiedzi, jednak były one nieistotne statystycznie. Porównanie wyników testerów smaku w grupie badanej oraz grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli 5 oraz 6.

Tabela 6. Porównanie wyników testerów smaku słodkiego i gorzkiego w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.

Tester smaku	Wskazanie	Proporcja	Grupa kontrolna SARS-CoV-2 (-)	Grupa badana SARS-CoV-2 (+)	Ogółem	p
Słodki 1 (40 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	22	15	37	0,003
		% z tester smaku	59,5%	40,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	61,1%	28,8%	42%	
	Błędne	Liczebność	14	37	51	
		% z tester smaku	27,5%	72,5%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	38,9%	71,2%	58%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Słodki 2 (80 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	32	43	75	0,313
		% z tester smaku	42,7%	57,3%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	88,9%	82,7%	85,2%	
	Błędne	Liczebność	4	9	13	
		% z tester smaku	30,8%	69,2%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	11,1%	17,3%	14,8%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Słodki 3 (106,4 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	36	46	82	0,038
		% z tester smaku	43,9%	56,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	88,5%	93,2%	
	Błędne	Liczebność	0	6	6	
		% z tester smaku	0%	100%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	0%	11,5%	6,8%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Gorzki 1 (40 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	33	42	75	0,132
		% z tester smaku	44%	56%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	91,7%	80,8%	85,2%	
	Błędne	Liczebność	3	10	13	
		% z tester smaku	23,1%	76,9%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	8,3%	19,2%	14,8%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	

Tabela 7. Porównanie wyników testerów smaku słonego i kwaśnego w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.

Tester smaku	Wskazanie	Proporcja	Grupa kontrolna SARS-CoV-2 (-)	Grupa badana SARS-CoV-2 (+)	Ogółem	p
Słony 1 (13,5 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	36	46	82	0,038
		% z tester smaku	43,9%	56,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	88,5%	93,2%	
	Błędne	Liczebność	0	6	6	
		% z tester smaku	0%	100%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	0%	11,5%	6,8%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	86	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Słony 2 (17 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	36	43	79	0,006
		% z tester smaku	45,6%	54,4%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	82,7%	89,8%	
	Błędne	Liczebność	0	9	9	
		% z tester smaku	0%	100%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	0%	17,3%	10,2%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	88	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Słony 3 (27 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	35	50	85	0,636
		% z tester smaku	41,2%	58,8%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	97,2%	96,2%	96,6%	
	Błędne	Liczebność	1	2	3	
		% z tester smaku	33,3%	66,7%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	2,8%	3,8%	3,4%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	86	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Kwaśny 1 (6,25 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	24	26	50	0,091
		% z tester smaku	48%	52%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	66,7%	50%	56,8%	
	Błędne	Liczebność	12	26	38	
		% z tester smaku	31,6%	68,4%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	33,3%	50%	43,2%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	86	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	
Kwaśny 2 (12,5 mg/ml)	Prawidłowe	Liczebność	34	44	78	0,138
		% z tester smaku	43,6%	56,4%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	94,4%	84,6%	88,6%	
	Błędne	Liczebność	2	8	10	
		% z tester smaku	20%	80%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	5,6%	15,4%	11,4%	
	Ogółem	Liczebność	36	52	86	
		% z tester smaku	40,9%	59,1%	100%	
		% z gr. SARS- CoV-2	100%	100%	100%	

W grupie badanej, testerem smaku, który najczęściej był błędnie identyfikowany przez pacjentów – 37 z 52 osób zakażonych – był tester Słodki 1. Spośród wszystkich błędnych identyfikacji testera Słodki 1, 72,5% stanowiły osoby z grupy badanej, 27,5% – osoby z grupy kontrolnej. Drugim testerem pod względem błędnej identyfikacji w grupie badanej był tester Kwaśny 1, błędnie zidentyfikowany przez 27 osób w tej grupie – jednak rozkład odpowiedzi pomiędzy grupami nie był znamieny statystycznie z powodu 12 błędnych identyfikacji testera w grupie kontrolnej. Testery Słony 1, Słony 2 oraz Słodki 3 błędnie zidentyfikowały jedynie osoby z grupy badanej (0% wyników fałszywie dodatnich), jednak były one błędnie identyfikowane w grupie badanej znacznie rzadziej niż tester Słodki 1 – odpowiednio przez 6 osób, 9 osób i 6 osób zakażonych. Testerami najrzadziej błędnie identyfikowanymi były testery Kwaśny 2 z 10 błędnymi identyfikacjami, łącznie, w obu grupach oraz Słony 3 z 3 błędnymi identyfikacjami, łącznie, w obu grupach. Całkowita ageusia, czyli brak odczuwania wszystkich smaków wystąpił tylko u 1 pacjenta w grupie badanej. W pozostałych przypadkach zaobserwowano mieszane zaburzenia odczuwania smaków pod postacią hipogeusii z zachowanym odczuwaniem wszystkich smaków przy podwyższonym progu czuciowym bądź z brakiem odczuwania niektórych smaków (rozdział 11 Suplement, tabela 9 i tabela 10).

8.2.3. Wartość predykcyjna poszczególnych testerów smaku

W tabeli 8 przedstawiono wartość diagnostyczną predykcyjnych modeli pierwotnych i wtórnych. Za pierwotny model predykcyjny uznano zmienne testowane podczas fazy głównej eksperymentu (kwestionariusz lub test smakowy). W skład kwestionariusza wchodziły wybrane, istotne statystycznie objawy podmiotowe uczestników badania (wymienione w Tabeli 3) takie jak: subiektywne zaburzenie węchu w ciągu ostatniego miesiąca, subiektywne zaburzenie smaku w ciągu ostatniego miesiąca, wystąpienie gorączki w ciągu ostatniego miesiąca. Wynik kwestionariusza uznawano za dodatni, gdy przynajmniej jeden, z powyższych objawów był obecny w ciągu ostatnich 30 dni poprzedzających udział w badaniu. Za model wtórny uznano dwa lub więcej modeli pierwotnych analizowanych łącznie. W tabeli 8 przedstawiono wybrane modele pierwotne i wtórne o największej czułości lub swoistości w diagnozowaniu zakażenia wirusem SARS-CoV-2.

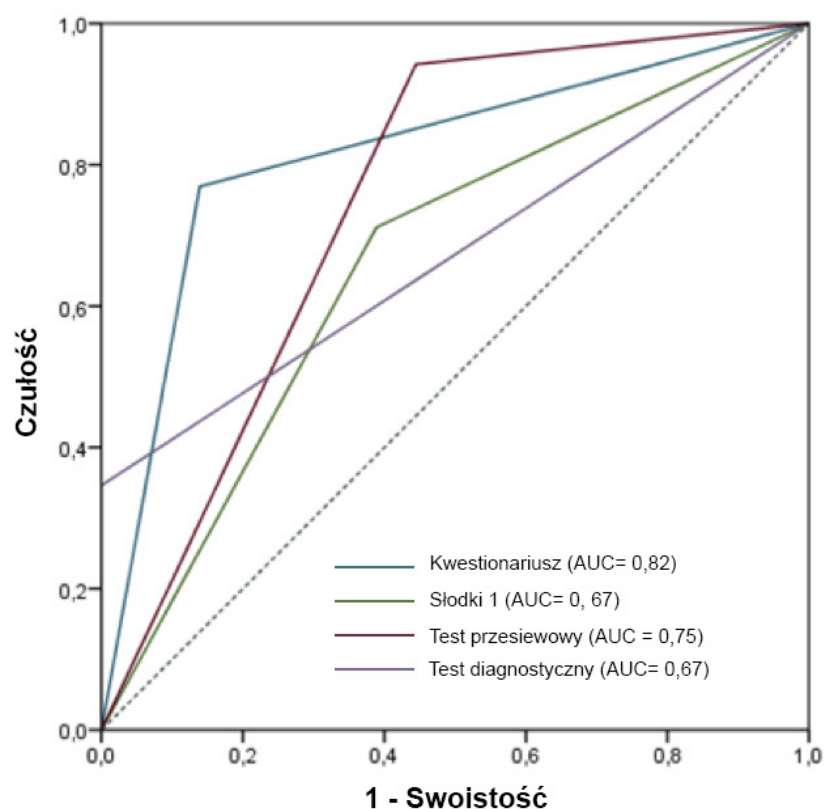
Tabela 8. Wartość diagnostyczna modeli predykcyjnych: swoistość, czułość, dodatnia wartość predykcyjna – PPV (ang. positive predictive value), ujemna wartość predykcyjna – NPV (ang. negative predictive value), ROC-AUC – pole pod krzywą ROC (ang. area under the receiver operating characteristic curve) dla wielkości próby n=88.

Model predykcyjny	Czułość	Swoistość	PPV	NPV	ROC-AUC
Modele pierwotne					
Kwestionariusz	0,77 (0,63-0,87)	0,86 (0,70-0,95)	0,89 (0,76-0,96)	0,72 (0,42-0,75)	0,82 (0,72-0,91)
Słodki 1	0,71 (0,57-0,83)	0,61 (0,43-0,77)	0,73 (0,58-0,84)	0,59 (0,42-0,75)	0,67 (0,56-0,78)
Słony 1	0,12 (0,04-0,23)	1 (0,9-1)	1 (0,54-1)	0,44 (0,33-0,55)	0,56 (0,44-0,68)
Słony 2	0,17 (0,8-0,3)	1 (0,9-1)	1 (0,66-1)	0,46 (0,34-0,57)	0,59 (0,47-0,7)
Słodki 3	0,12 (0,04-0,23)	1 (0,9-1)	1 (0,54-1)	0,44 (0,33-0,55)	0,56 (0,44-0,68)
Modele wtórne					
Test przesiewowy	0,94 (0,84-0,99)	0,55 (0,38-0,72)	0,75 (0,63-0,85)	0,87 (0,66-0,97)	0,75 (0,64-0,86)
Test diagnostyczny	0,34 (0,22-0,49)	1 (0,90-1)	1 (0,81-1)	0,51 (0,39-0,64)	0,673 (0,56-0,78)

Adnotacja. Kwestionariusz dawał wynik pozytywny, jeśli obecny był co najmniej jeden z następujących objawów: subiektywna utrata smaku, subiektywna utrata węchu lub gorączka w ostatnim miesiącu. Modele pierwotne: modele predykcyjne składające się z pojedynczego testu smakowego lub zestawu objawów podmiotowych (Kwestionariusz); do grupy modeli pierwotnych wybrano testery smaków istotne statystycznie; modele pochodne: modele predykcyjne składające się z dwóch lub więcej modeli podstawowych; test przesiewowy: Kwestionariusz i Słodki 1; Test diagnostyczny: Słony 1, Słony 2 i Słodki 3.

Modelem pierwotnym (subiektywnym) o największej czułości (77%) był kwestionariusz medyczny. Obiektywnym modelem pierwotnym (testem smaku) o najwyższej czułości (71%) był tester smaku Słodki 1. Oceniane w badaniu zmienne (modele pierwotne) dobrano i dopasowano do dwóch grup, w celu stworzenia modeli pochodnych- o największej czułości (test przesiewowy) i największej swoistości (test diagnostyczny). Test przesiewowy miał 94% czułości i 55% swoistości, podczas gdy test diagnostyczny miał 34% czułości i 100% swoistość w diagnostyce COVID-19. Dla każdego modelu przedstawiono dodatkowo dodatnią i ujemną wartość predykcyjną oraz obliczono pole pod krzywą ROC.

Na podstawie danych z tabeli 8 stworzono krzywe ROC (Rycina 4), dla poszczególnych modeli predykcyjnych pierwotnych i wtórnych, wraz z wyliczeniem pola pod krzywą AUC.



Rycina 4. Krzywe ROC dla pierwotnych modeli predykcyjnych (Kwestionariusz, Słodki 1) o największym polu pod krzywą (AUC) oraz wtórnych modeli predykcyjnych (Test przesiewowy, Test diagnostyczny).

Adnotacja. Test przesiewowy: Kwestionariusz i Słodki 1; Test diagnostyczny: Słony 1, Słony 2 i Słodki 3.

Spośród modeli predykcyjnych, pierwotnych, subiektywnych, największym polem pod krzywą ROC (ROC-AUC=0,82) cechował się zestaw objawów podmiotowych: subiektywna utrata smaku w ciągu ostatniego miesiąca, subiektywna utrata węchu w ciągu ostatniego miesiąca lub gorączka w ciągu ostatniego miesiąca, czyli Kwestionariusz.

Spośród modeli predykcyjnych, pierwotnych, obiektywnych, największe pole pod krzywą ROC (ROC-AUC=0,67) miał tester Słodki 1. Pole pod krzywą ROC było jednak w przypadku tego modelu mniejsze od wartości ROC-AUC dla Kwestionariusza (ROC-AUC=0,82).

Stworzone wtórne modele predykcyjne prezentowały następujące wartości pola pod krzywą ROC: test przesiewowy (ROC-AUC=0,75), test diagnostyczny (ROC-AUC=0,67) czyli taka sama wartość ROC-AUC jak w przypadku testera Słodki 1.

9. DYSKUSJA

W przedstawionej pracy wykazano, że prawie 70% młodych pacjentów, bez chorób współistniejących, zakażonych SARS-CoV-2 zgłosiło subiektywne zaburzenia węchu, a ponad 60% z nich zgłosiło zaburzenia smaku (tabela 3). Wartości te są około 10 razy wyższe niż w grupie kontrolnej, w której odpowiednio 8% i 6% pacjentów zgłosiło zaburzenia zapachu i smaku. Wykazano, że smakami, które były istotnie częściej zaburzone u pacjentów z dodatnim wynikiem SARS-CoV-2, był smaki słodki przy najniższym i najwyższym stężeniu substancji smakowej – sacharozy (40 mg/ml oraz 106,4 mg/ml) oraz smak słony przy najniższym i średnim stężeniu chlorku sodu (13,5 mg/ml oraz 17 mg/ml). Wyniki pozostałych testów smaku były nieznamiennie statystycznie ze względu na ograniczoną populację objętą badaniem – przebadano całą dostępną badaczom populacji studentów objętych kwarantanną w odkrytym ognisku wirusa. W grupie badanej, tylko u jednego pacjenta (1,9% grupy badanej) stwierdzono ageusię, rozumianą jako całkowity zanik odczuwania przez pacjenta smaku, poprzez błędna identyfikacja wszystkich testerów smakowych (tabela 9). Wartość ta jest zbliżona to raportowanej przez Vaira i wsp. w populacji pacjentów z Włoch (1,4%) (247).

Poniższa praca potwierdza i dowodzi, że chemosensoryczne zaburzenia smaku występują wcześniej w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i mogą być traktowane jako objaw COVID-19 oraz mogą być stosowane jako narzędzie diagnostyczne, zwłaszcza do celów badań przesiewowych. Obserwacje te są zbieżne z aktualnymi danymi literaturowymi (248-250). W pracy wskazano także, że również w grupie osób niezakażonych wirusem SARS-CoV-2, może istnieć duży odsetek osób z zaburzeniami smaku, w szczególności o typie hypogeusii, co także odzwierciedla obecny stan wiedzy (251).

Wyniki niniejszej pracy, podobnie jak wyniki dotychczasowych publikacji wskazują, że zarówno smak słodki (247, 252, 253) jak i słony (254, 255) mogą być szczególnie zaburzone u pacjentów z COVID-19. W badaniu Vaira i wsp. ocenione zostały funkcje smakowe i węchowe 72 pacjentów szpitala Uniwersyteckiego w Sassari we Włoszech, 27 mężczyzn i 45 kobiet, w średnim wieku 49,2 lat, przebywających na oddziałach leczenia COVID-19, z rozpoznaniem zakażeniem wirusem SARS-CoV-2. W grupie badanej 51,4% pacjentów w obiektywnym badaniu testerami smakowymi prawidłowo zidentyfikowało wszystkie smaki. Pozostała grupa, błędnie identyfikująca przynajmniej jeden smak, najczęściej nieprawidłowo

identyfikowała smak słodki (23 pacjentów) i kwaśny (21 pacjentów) (247). Grupa ta miała jednak oceniane zaburzenia smaku stosunkowo późno od wystąpienia pierwszych objawów choroby – po 19,3 dnia. Najprawdopodobniej więc chorzy z tej grupy znajdowali się w fazie regresji zaburzeń węchu i smaku. Należy jednak zauważyć, że funkcje smakowe testowane były z wykorzystaniem wyłącznie jednego stężenia danej substancji smakowej.

W badaniu przeprowadzonym przez autora niniejszej pracy, smak pacjentów oceniono średnio w 5 dniu (min 1; max 8) od otrzymania dodatniego wyniku w kierunku zakażenia wirusem SARS-CoV-2. W związku z sytuacją epidemiczną badanej grupy chorych, przebywali oni w jednym internacie przy Szkole Głównej Służby Pożarniczej (SGSP), nie udało się ustalić wiarygodnego czasu od wystąpienia pierwszych objawów chorobowych do przeprowadzenia oceny smaku. Związane jest to między innymi z faktem, że gdy przeprowadzono niniejsze badanie w maju 2020 roku, ognisko zakażenia w SGSP było jednym z pierwszych dużych ognisk epidemiologicznych w Polsce. Testowano więc wszystkich pracowników i studentów, także tych bezobjawowych. Poza tym, większość pacjentów nie zwracała uwagi na niepatognomiczne objawy COVID-19, takie jak na przykład ból głowy czy kaszel, a w związku z tym nie była w stanie podać dokładnego początku występowania danego objawu. Zakładając jednak, że pierwsi studenci mieli wykonane testy na 8 dni przed badaniem smaku, w tamtym momencie w ognisku epidemicznym musiały znajdować się osoby objawowe, z których powodu podjęto decyzję o masowych testach. Zakładając 2 dodatkowe dni na działania administracyjne związane z masowymi testami i kwarantanną uczelni oraz średni czas inkubacji wirusa SARS-CoV-2 wynoszący 5 dni (16, 43), pacjent zero pojawił się więc przypuszczalnie w ognisku epidemicznym, gdzie doszło do zakażenia badanej przez nas grupy, na około 15 dni przed przeprowadzeniem fazy głównej badania.

Fakt występowania zaburzeń smaku i węchu jako jednych z pierwszych objawów COVID-19 może stanowić podstawę do szybkiej diagnozy i skutecznego zarządzania zdrowiem publicznym. Po identyfikacji zaburzeń smaku i węchu w przebiegu COVID-19, niektóre instytucje zaczęły używać kwestionariuszy identyfikujących utratę węchu i smaku jako metody przesiewowej oceny personelu (256).

Niedawno zaburzenia smaku i zapachu zostały oficjalnie uznane za objawy COVID-19 i wymienione jako kluczowe czynniki diagnostyczne tej choroby (257-259). Światowa Organizacja Zdrowia uznała zaburzenia smaku i węchu jako objawy COVID-19

w kwietniu 2020 r. co wynika prawdopodobnie z różnej częstości występowania tego objawu w Chinach (początek pandemii) oraz Europie i USA (260). Dopiero niedawno dostrzeżono wartość diagnostyczną anosmii i zaburzeń smaku w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2. Co ciekawe, badania wskazują, że zaburzenia węchu i smaku są jednym z pierwszych objawów, które występują także w przypadku bezobjawowego zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (261). Analiza bazy danych stworzonych przez Amerykańską Akademię Otolaryngologii i Chirurgii Głowy i Szyi do raportowania przypadków anosmii i anosmii w populacji pacjentów COVID-19 wykazała, że zaburzenia węchu i smaku wystąpiły u 73% pacjentów przed postawieniem diagnozy COVID-19 a u 26.6% pacjentów był to pierwszy objaw zakażenia (262).

W populacji 112 izraelskich pacjentów ze średnio- nasilonymi objawami COVID-19 wykazano, że zaburzenia smaku i węchu były jednymi ze wcześniejszych objawów zakażenia wirusem SARS-CoV-2 – jednak nie najwcześniejszymi. Objawami które jako pierwsze występowały u ponad jednej trzeciej ankietowanych pacjentów, były: ból głowy, gorączka, suchy kaszel oraz bóle mięśni. Zaburzenia węchu występowały średnio po $3,9 \pm 5,5$ dnia od wystąpienia pierwszych objawów choroby, zaburzenia smaku nieznacznie później (po $4,5 \pm 5,7$ dniach. U odpowiednio 15% i 18% chorych zaburzenia smaku i zapachu były pierwszym objawem zakażenia. Zaburzenia smaku utrzymywały się odpowiednio u 35% i 41% pacjentów przez $17,2 \pm 17,6$ dnia w przypadku smaku i przez $18,9 \pm 19,7$ dnia w przypadku węchu (263).

W innym badaniu przeprowadzonym przez Sakali i wsp. opisano wyniki telefonicznego badania ankietowanego przeprowadzonego na 172 pacjentach, bez ostrej niewydolności oddechowej, ze średnio nasilonymi objawami COVID-19, w Turcji. W opisywanej populacji 81 pacjentów (47,1%) zgłosiło utratę smaku a osiemdziesięciu ośmiu pacjentów (51,2%) zgłosiło utratę węchu. W badanej grupie rozpoznanie COVID-19 stawiano średnio $4,3$ dnia \pm $3,2$ dnia od wystąpienia objawów zakażenia wirusem, autorzy nie wskazali jednak jakie objawy wystąpiły w badanej populacji jako pierwsze. Średni czas od wystąpienia zaburzenia smaku do uzyskania poprawy klinicznej wyniósł $8,20 \pm 7,07$ dni, przy czym kompletne ustąpienie objawów zaburzeń smaku w tym czasie odnotowano u 23,4% pacjentów, u 22,2% pacjentów nie wystąpiła żadna poprawa odczuwania smaku (264). Tak więc w badaniu izraelskim zaburzenia węchu i smaku utrzymywały się prawie dwukrotnie dłużej niż w badaniu tureckim.

W jeszcze innym badaniu przeprowadzonym we Włoszech na populacji 100 pacjentów COVID-19, czas do ustąpienia objawów zaburzeń smaku lub węchu był stosunkowo krótki, u większości pacjentów poprawa nastąpiła w ciągu 4 tygodni. Co ciekawe średni czas do wystąpienia poprawy klinicznej zaburzeń węchu/smaku był znacznie dłuższy dla kobiet niż dla mężczyzn (26 vs. 14 dni) (265).

W innym badaniu Huart i wsp. na populacji pacjentów belgijskich (10 pacjentów z potwierdzonym COVID-19, dziesięciu – z potwierdzonym wirusem grypy oraz 10 – z grupy kontrolnej) przeprowadzono obiektywne testy zaburzeń smaku i węchu (266). Do obiektywnego badania zmysłu węchu i smaku użyto zwalidowanych wcześniej testów paskowych (267). W populacji pacjentów COVID-19 najbardziej zaburzonym w odczuwaniu smakiem był smak słodki a także gorzki. Autorzy przeprowadzili analizę zaburzeń poszczególnych smaków jako niezależnych testów wykrywających infekcję wirusem SARS-CoV-2. Test polegający na ocenie smaku słodkiego miał 100% czułości i 60% swoistości, test oceny smaku gorzkiego – 90% czułości i 80% swoistości. Do wyników tego badania podchodzić należy jednak ostrożnie, ze względu na małą próbę badawczą.

Autorzy powyższej pracy zaproponowali interesującą hipotezę łączącą zaburzenia dwóch najbardziej zaburzonych smaków w ich grupie badawczej – gorzkiego i słodkiego. Odczuwanie obu tych smaków związane jest z receptorami sprzężonymi z białkami G (ang. G protein-coupled receptors – GPCR). Uważa się ponadto, że receptory klasy GPCR odpowiadają za odczuwanie smaku umami. Receptory GPCR stanowią najliczniejszą rodzinę białek sygnałowych u człowieka – koduje je ponad 800 ludzkich genów. Receptory te biorą udział w prawie każdym procesie fizjologicznym u ssaków, w tym w odpowiedzi immunologicznej. Nazwą białka G określana jest szeroka grupa białek posiadających zdolność wiązania nukleotydów guaninowych – GDP i GTP – posiadających aktywność GTPazy. Receptory GPCR charakteryzują się obecnością 7 hydrofobowych domen transbłonowych, zbudowanych z 22-28 reszt aminokwasowych. Dlatego też receptory te nazywane są czasami receptorami R7G (268). Istnieją wstępne doniesienia naukowe mówiące o tym, że blokada pojedynczego receptora GPCR może złagodzić ciężkość i śmiertelność związaną z ARDS w COVID-19 (269).

Dla odmiany, transdukcja smaku kwaśnego i słonego wykorzystuje kanały jonowe: protonowe (H^+) dla smaku kwaśnego oraz sodowe (Na^+) dla smaku słonego. O percepcji tych dwóch smaków wiadomo natomiast znacznie mniej (270, 271).

W przeciwieństwie do smaku słonego oraz kwaśnego percepcja smaków związanych z białkami GPCR – słodkiego, gorzkiego oraz umami jest znacznie lepiej poznana. Receptorem smaku słodkiego jest heterodimer dwóch receptorów T1R2/T1R3 (ang. taste receptor type 1 members 2 and 3). Receptor ten odpowiada wszystkim znanym substancjom słodkim, jak również inhibitorom słodkiego smaku – takim jak laktiozol (272). Pojedynczy receptor dla smaku słodkiego posiada kilka różnych miejsc wiązania. Równoczesne zajęcie kilku takich miejsc wzmacnia reakcję na słodki smak. Podobnie wygląda receptor dla smaku umami, który również jest heterodimerem dwóch receptorów – T1R1 oraz T1R3 – którą to podjednostkę dzieli ze smakiem słodkim. W odróżnieniu od receptora słodkiego, receptor umami reaguje głównie na L-glutaminian (poza tym wykazano, że słabą pobudliwością w stosunku do tego receptora cechują się także nukleotydy purynowe: monofosforan inozyny (IMP) i guanozynomonofosforan (GMP)) (273). Smak gorzki, w przeciwieństwie do smaków słodkiego i umami pełni funkcję ochronną – ma za zadanie identyfikację trucizn i innych szkodliwych substancji. W związku z powyższym receptory dla smaku gorzkiego muszą odpowiadać wielu strukturalnie różnych cząsteczkom. Zidentyfikowano 25 receptorów smaku gorzkiego (TAS2R) kodowane przez geny receptora smaku typu 2 (274).

Wciąż nie jest wiadomo jaki receptor dokładnie zaangażowany jest w percepcję jonów sodu, jednak najbardziej prawdopodobny wydaje się nabłonkowy kanał sodowy (ang. epithelial sodium channel – ENaC) (275). Otopetrin-1, kanał jonowy, selektywny względem protonów, który do tej pory wiązany był z odczuwaniem grawitacji w układzie przedsionkowym, został powiązany z pośrednictwem odczuwania smaku kwaśnego (276). Z odczuwaniem smaku kwaśnego wiązany jest także inny receptor dla kanału kationowego z podrodziny V, członek 1 (ang. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 – TRPV1), znany również jako receptor kapsaicyny. Receptor ten wiązany jest częściej z percepcją czynników drażniących i uszkodzających tkanki, w tym właśnie kapsaicyny występującej w papryczkach chili (277).

Interesującym wydaje się fakt, że jedna z izoform receptora gorzkiego – białkowy receptor smaku gorzkiego typu 2 numer 38 (ang. bitterness-sensing protein taste receptor type-2

member 38 – TAS2R38) – prawdopodobnie wykazuje związek z przebiegiem klinicznym COVID-19 (278). Wcześniej wykazano związek tego receptora z masą ciała, BMI i otyłością (279-281), ciężkością przebiegu mukowiscydozy (282). Receptor ten rozpoznaje również substancje pochodzenia bakteryjnego, takie jak laktony acylo-homoseryny, wydzielane przez kilka bakterii Gram-ujemnych, w tym *P. aeruginosa*. Z drugiej strony wiadomo także, że receptor TAS2R38 i inne receptory dla smaku gorzkiego i słodkiego są obecne w rzęskach górnych dróg oddechowych i komórkach chemosensorycznych nosa (283, 284). Częstotliwość ruchu rzęsek, wydzielanie białek immunologicznych oraz tlenku azotu jest promowane przez te receptory po ich aktywowaniu przez produkty bakteryjne (285). Co ciekawe, substancje będące agonistami receptorów smaku gorzkiego (TAS2Rs) wykazują działanie przeciwnowotworowe. Będący agonistą receptora TAS2R38 – izotiocyjanian allilu w badaniach wykazał cechy leku przeciwnowotworowego (286, 287). Kwercetyna i naringenina, agoniści receptora TAS2R14, wykazywały aktywność przeciwnowotworową między innymi przeciwko neuroblastomie (286, 288, 289). Wykazano także, że w komórkach raka piersi dochodzi do regulacji w dół receptorów TAS2R (290).

Trzy miejsca polimorficzne w sekwencji TAS2R38 powodują substytucje aminokwasów w pozycjach Pro49Ala, Ala262Val i Val296Ile, dając początek dwóm powszechnym haplotypom: PAV – wariant dominujący (osoby odczuwające smak- ang. taster) i AVI – recesywny (osoby nieodczuwające smaku- ang. non-taster) (291). TAS2R38 może występować z różnymi polimorfizmami, takimi jak PAV/PAV (ang. supertaster), PAV/AVI (ang. taster) i AVI/AVI (ang. non-taster). Co ciekawe, polimorfizm ten ocenić można pośrednio bez przeprowadzania badań genetycznych poprzez ocenę odczuwania smaku gorzkiego za pomocą takich substancji jak m.i. 6-n-propylotiouracyl (PROP) i fenylotiokarbamid (PTC). Po raz pierwszy odkrył to Fox już w 1932 roku (292) który zauważył że około 30% badanej przez niego populacji nie odczuwała w ogóle smaku gorzkiego fenylotiokarbamidu. Później, w 1958 roku obserwacje te potwierdzi i rozwinął Kalamus dla 6-n-propylotiouracylu (293). Osoby z polimorfizmem PAV/PAV odczuwały silnie gorzki smak tych dwóch substancji, z PAV/AVI odczuwały gorzki smak umiarkowanie silnie, z AVI/AVI nie odczuwały zaś gorzkiego smaku w ogóle. W badaniu Smith i wsp. przeprowadzonym na populacji 175 osób w wieku 18 – 85 lat wykazano, że obecność haplotypu PAV była związana z mniejszym spożyciem warzyw, natomiast nie miała wpływu na sól, cukier ani tłuszcze nasycone w diecie (294). Osoby z haplotypem PAV prawdopodobnie rzadziej spożywały warzywa

krzyżowe, takie jak: brokuły, brukselka, kalafior, kapusta, prawdopodobnie z powodu gorzkiego smaku tych produktów.

Wcześniejsze badania wskazywały na mniejszą ilość zakażeń górnych dróg oddechowych bakteriami gram-ujemnymi a także wyższą jakość życia osób będących homozygotami dominującymi PAV/PAV (supertasters) w porównaniu z heterozygotami PAV/AVI (tasters) czy homozygotami recesywnymi (AVI/AVI). Jest to prawdopodobnie związane z faktem, iż receptory gorzkiego smaku (T2R) uczestniczą w odporności wrodzonej i są obecne między innymi w komórkach nabłonka rzęskowego zatok i nosa (295).

W badaniach Barham i wsp. (278) na populacji 100 pacjentów z potwierdzonym zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 w badaniu PCR, okazało się, że wszyscy pacjenci objęci badaniem którzy wymagali hospitalizacji (21/100) z powodu zaostżenia niewydolności oddechowej w przebiegu COVID-19 byli homozygotami AVI/AVI (non-tasters) receptora T2R38. Wszyscy zaś pacjenci, którzy nie wymagali hospitalizacji (79/100) przechodzili COVID-19 w sposób symptomatyczny. Skłoniło ich to do zgłoszenia się do szpitala – byli oni heterozygotami PAV/AVI (tasters). W badanej populacji nie było homozygot PAV/PAV (supertasters) co wskazywać mogło, że osoby te przechodziły COVID-19 w sposób asymptomatyczny. W związku z powyższym nie zgłaszali się do szpitala. W opisywanym badaniu ekspresja fenotypowa T2R38 oceniana była smakowym testem paskowym (papier lakmusowy) zawierającym: kontrolę (bez substancji smakowej), fenyloitiokarbamid (PTC), tiomocznik i benzoesan sodu. Homozygoty PAV/PAV odczuwały intensywny gorzki smak elementów na pasku testowym, podczas gdy homozygoty AVI/AVI nie odczuwały żadnego smaku. Heterozygoty PAV/AVI rozpoznają smak gorzki, jednak o nieznacznym nasileniu.

Li i wsp. przebadali inną izoformę receptora gorzkiego TAS2R10 – która jak stwierdzono, podobnie do TAS2R38, jest zaangażowana w zwalczanie chorób zakaźnych wywoływanych przez bakterie, wirusy i pasożyty (296). Badacze przeanalizowali znane substancje chemiczne mogące być agonistami powyższego receptora. Zidentyfikowali takie jak: chlorfeniramina, difenhydramina i famotydyna, które, jak sugerują autorzy publikacji, mogą potencjalnie wpływać na łagodzenie przebiegu COVID-19.

W jeszcze innym badaniu ankietowym przeprowadzonym przez Biadsee i wsp. (253) na populacji 140 pacjentów z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 z Izraela, gdzie oceny

zaburzeń dokonano na podstawie kwestionariuszy internetowych wypełnianych przez pacjentów, stwierdzono, że smak słodki był najbardziej zaburzonym smakiem. Zaburzenie to zgłosiło 62 ze 140 osób. Drugim w kolejności najbardziej zaburzonym smakiem był smak słony – 54 ze 140 osób. Zaburzenia pozostałych smaków opisano następująco: zaburzenie smaku gorzkiego – 52 ze 140 osób, smaku kwaśnego – 53 osób. Sześćdziesięciu sześciu pacjentów spośród badanej grupy 140 osób, co stanowiło 52% badanej populacji, zgłosiło zaburzenie któregośkolwiek ze smaków.

Inne badania wskazują natomiast, że smak słony, który był kolejnym obok smaku słodkiego, istotnie statystycznie zaburzonym smakiem w badanej, w niniejszej pracy, populacji, jest smakiem najbardziej zaburzonym przez wirusa SARS-CoV-2. Salmon *wsp.* przeprowadzili badanie ankietowe (255), które miało na celu ustalenie odsetka pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2 spośród osób zgłaszających się do szpitala z zaburzeniem węchu. W populacji 1824 pacjentów przebadanych pod kątem COVID-19 dodatnia wartość predykcyjna i specyficzność utraty węchu i/lub smaku wyniosły odpowiednio 78,5% i 90,3% (czułość (40,8%), ujemna wartość predykcyjna – 63,6%). Utrata węchu wiązała się dodatkowo z uczuciem utraty smaku u 46 pacjentów (83,6%): częściowa utrata wystąpiła u 47,3%, a agueuzja u 36,4% pacjentów. Wśród osób z zaburzeniami smaku błędne rozpoznawanie smaku słonego było najczęściej zgłaszaną dysfunkcją (47,8%). Drugim najbardziej zaburzonym smakiem był smak słodki (34,9%).

Kolejnym badaniem stwierdzającym heterogeniczny rozkład zaburzeń poszczególnych smaków, z dominującym zaburzeniem smaku słonego, jest greckie badanie Konstantinidis *i wsp.* W badaniu tym pacjenci z potwierdzonym zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 byli poproszeni o określenie subiektywnej intensywności odczuwanych smaków i zapachów. Najbardziej zaburzonymi smakami, podobnie jak w niniejszej pracy, był smak słony oraz słodki (297). W powyższym badaniu Konstantinidis *i wsp.* istniała dysproporcja między zaburzeniami węchu (36,7% pacjentów), a zaburzeniami smaku (27,8%), z taką samą częstością występowania dysfunkcji u obu płci. Średni czas od wystąpienia objawów do poprawy stanu klinicznego wyniósł 4 tygodnie, przy czym jedna trzecia pacjentów po tym okresie nie odczuła żadnej poprawy.

Po przeanalizowaniu odczuwania smaków w grupie badanej niniejszego badania, biorąc pod uwagę błędne rozpoznanie smaku o najwyższym stężeniu dla danego smaku (to jest

Słodki 3, Słony 3, Kwaśny 2, Gorzki 1) otrzymujemy następujące rozkłady błędnych identyfikacji danego smaku w populacji osób zakażonych wirusem SARS-CoV-2: gorzki 19,2% (10/52), kwaśny 15,3% (8/52), słodki 11,5% (6/52), słony 3,8% (2/52). Zaskakiwać może fakt, że jedyny istotnie statystycznie test, z grupy najwyższych stężeń substancji smakowej (Słodki 3), znalazł się dopiero na trzecim miejscu pod względem błędnych identyfikacji, za smakiem gorzkim i kwaśnym. Należy pamiętać jednak, że zgodnie z wynikami badania pilotażowego, smak gorzki przetestowany został w jednym stężeniu, smak kwaśny w dwóch, słodki i słony zaś w trzech różnych stężeniach. Co za tym idzie, nie można wykluczyć, że przy zastosowaniu wyższych stężeń smaku gorzkiego i kwaśnego te mogłyby zostać zidentyfikowane prawidłowo. Co więcej, istnieje przypuszczenie, że w przypadku podwyższenia progu smakowego dla danej substancji, w przebiegu COVID-19, możliwe, że dawka uprzednio supramaksymalna, nierozróżnialna od dawki o niższym natężeniu, a co za tym idzie odrzucona w badaniu pilotażowym, mogłaby wywołać stymulację smakową.

Szczególnie w przypadku zaburzeń smaku słodkiego w grupie badanej, można stwierdzić, że powszechnym zjawiskiem zdaje się być podwyższenie progu odczuwania smaku dla danej substancji. (71% błędnych identyfikacji najniższego stężenia smaku słodkiego w stosunku do 11,5% błędnej identyfikacji najwyższego stężenia smaku słodkiego). Rzadko jednak występuje całkowity brak odczuwania konkretnego smaku. Jednym z potencjalnych mechanizmów tego zjawiska może być poziom wirēmii wirusa SARS-CoV-2 w organizmie gospodarza oraz zakres struktur zainfekowanych przez wirusa (298).

Do tej pory niewiele prac dotyczących zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19 uwzględniało w analizach badań wpływ infekcji wirusa SARS-CoV-2 na zaburzenia poszczególnych smaków. Autor zidentyfikował 6 prac ze szczegółową analizą tego czynnika (247, 253-255, 266, 297). Spośród zidentyfikowanych prac cztery oceniały zaburzenia smaku w sposób subiektywny (kwestionariusze), dwa zaś w sposób obiektywny (testery smaku).

Badanie Huarta i wsp. przeprowadzone na populacji pacjentów belgijskich metodą obiektywną stwierdza, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słodki oraz gorzki (266). Badanie Vaira i wsp. na populacji pacjentów włoskich metodą obiektywną donosi, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słodki oraz kwaśny (247). Badanie Biadsee i wsp. na populacji pacjentów izraelskich metodą subiektywną raportuje, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słodki oraz słony (253). Badanie Salmon i wsp. na populacji pacjentów

francuskich metodą subiektywną stwierdza, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słony oraz słodki (255). Badanie Parma i wsp. na populacji pacjentów angielskich, francuskich, niemieckich, włoskich, japońskich, kanadyjskich, norweskich, hiszpańskich, szwedzkich i tureckich metodą subiektywną stwierdza, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słony oraz słodki (254). Wreszcie badanie Konstantinidis i wsp. na populacji pacjentów greckich metodą subiektywną stwierdza, że najbardziej zaburzonymi smakami są: słony oraz słodki (297).

Jak widać w powyższej analizie, najczęściej raportowanym zaburzeniem smaku, zarówno w badaniach z subiektywną jak i obiektywną oceną smaku, jest smak słodki. Uwagę zwracają natomiast rozbieżności w raportowaniu zaburzeń pozostałych smaków pomiędzy subiektywnymi i obiektywnymi badaniami. W badaniach subiektywnych najczęściej raportowanym zaburzeniem smaku, częściej nawet niż smak słodki, jest smak słony. Badania obiektywne wskazują zaś na smak kwaśny i gorzki jako najbardziej zaburzone, obok smaku słodkiego.

Różnice te wynikać mogą z rozpowszechnienia występowania poszczególnych smaków w produktach spożywczych oraz preferencji dietetycznych, które sprawiają, że pacjenci zwracają uwagę głównie na smak słodki oraz słony (299, 300).

Interesującym zdaje się być fakt, iż w grupie badanej zarówno smak słodki (Słodki 3) jak i słony (Słony 3) były upośledzone u mniejszej liczby pacjentów niż smak gorzki (Gorzki 1) oraz kwaśny (Kwaśny 2), w przypadku testerów smaku o najwyższym stężeniu substancji smakowej dla danego smaku (tabela 7).

W badaniu populacji amerykańskiej Yan i wsp. stwierdzili zaburzenia smaku zgłaszane samodzielnie przez 71% pacjentów z SARS-CoV-2 i 17% osób niezainfekowanych (301). Podobnie jak w niniejszym badaniu, wiele osób z grupy kontrolnej miało objawy grypopodobne, w tym nieżyt nosa i ból gardła. Wyniki te wydają się być porównywalne do opisanych przez autora, gdzie w grupie kontrolnej tylko 8% pacjentów zgłosiło subiektywne wyniki zaburzenia smaku (tab.1), chociaż prawie 39% pacjentów z tej grupy błędnie zidentyfikowało słodki smak o niskiej intensywności (Słodki 1 – sacharoza 40 mg/ml). Dysproporcja ta, spowodowana dyskretną dysgeuzią, może być spowodowana utratą węchu z powodu niedrożności nosa, a nie utraty smaku. Mechanizm ten może pokrywać się

z postulowanymi mechanizmami zaburzeń smaku w zaburzeniach układu renina-angiotensyna związanych z COVID-19 (302).

Omówienia wymaga proporcja różnic w błędnej identyfikacji smaku Słodki 1 o niskim stężeniu (sacharoza 40 mg/ml) między grupami SARS-CoV-2 dodatnią (71% błędnych identyfikacji) i ujemną (39% błędnych identyfikacji) w stosunku do różnic w subiektywnym poczuciu zaburzeń smaku pomiędzy grupami badaną (62% deklarowanych zaburzeń smaku) i kontrolną (6% deklarowanych zaburzeń smaku). Dysproporcja ta, widoczna w szczególności w grupie kontrolnej (39% obiektywnych zaburzeń w stosunku do 6% subiektywnych), wynikać może z faktu, iż pacjenci zauważają dopiero silne zaburzenia w odczuwaniu smaku i zapachu, pomijając dyskretne zaburzenia, które wykryte mogą być odpowiednimi testami. Dziwić może także wysoki odsetek błędnych identyfikacji smaku Słodkiego 1 (14 z 36 pacjentów – 39% badanej grupy) wśród osób niezakażonych wirusem SARS-CoV-2. Pamiętać należy jednak, że w grupie kontrolnej aż 36% osób zgłosiło objawy grypopodobne- nieżyt nosa i/lub ból gardła, co mogło być związane z podniesieniem progu smakowego (hypogeusii) w tym teście (303, 304). Pomimo, iż powszechnie uważa się, że objawy kataralne nie towarzyszą zakażeniu SARS-CoV-2, w meta- analizie Manish i wsp. wskazano, że obstrukcja nosa występuje u 26% pacjentów COVID-19 (305). W badaniu Henkina i wsp. podsumowującym 40-letnie doświadczenia ośrodka z Waszyngtonu w USA w leczeniu ponad 5000 pacjentów z zaburzeniami smaku, najczęstszą przyczyną tych zaburzeń (27%) były właśnie zaburzenia związane z infekcją wirusową (ang. post influenza-like hyposmia and hypogeusia – PVOD) (306). Warto także zwrócić uwagę, że niniejsze badanie przeprowadzono w maju - miesiącu który jest szczytem zachorowań na PVOD (196). Ponadto zaburzenia związane z infekcjami wirusowymi powodują około 40% wszystkich zaburzeń chemosensorycznych (307). W przeprowadzonych do tej pory badaniach porównujących zaburzenia smaku w COVID-19 w stosunku do innych chorób układu oddechowego, w tym grypy, częstość zaburzeń smaku w grupach niezakażonych SARS-CoV-2 wynosiła 10% (308), 14% (309), 17% (310), 20% (311). Biorąc pod uwagę fakt, iż były to badania ankietowe, przypuszczać można, że część pacjentów z dyskretnymi objawami mogła nie odczuć zaburzeń smaku i nie zareportować ich w kwestionariuszu. Warto nadmienić także, że zaburzenia węchu i smaku w populacji ogólnej występują znacznie częściej niż można byłoby przypuszczać. W przeprowadzonym w 2016 roku badaniu amerykańskim oceniono obiektywnymi testami smak i węch wśród 3519 zdrowych osób. Zaburzenia smaku i węchu zdiagnozowano odpowiednio u 13,5% i 17,3% osób (312).

Rozważyć należy oczywiście, że tester Słodki 1 mógł mieć zbyt niskie stężenie substancji smakowej do zidentyfikowania, nawet przez zdrowe osoby. Stężenie smaku testerów w badaniu pilotażowym dobrano jednak w ten sposób, aby 90% zdrowej populacji poprawnie rozpoznało ten smak – wychodząc z założenia, że zdrowa skądinąd populacja może składać się z osób o podwyższonych progach smakowych, z różnych powodów. Tak więc podobnej wartości, zbliżonej do 10% należało się spodziewać w grupie kontrolnej. Nadmienić należy jednak, że 6 z 14 pacjentów (43%), którzy niewłaściwie zidentyfikowali tester Słodki 1 w grupie kontrolnej, niewłaściwie zidentyfikowało co najmniej jeden dodatkowy tester poza testerem Słodki 1 (Tabela 10).

Mechanizm zaburzeń smaku może być związany z zaburzeniem węchu w COVID-19. Zaburzenie węchu zaś, mogą być patologią pierwotną do zaburzeń smaku, co sugerują niektórzy autorzy (313). Inni badacze jednak, na podstawie obiektywnych badań zaburzeń węchu i smaku oraz występujących izolowanych przypadków zaburzeń smaku, bez zaburzeń węchu twierdzą, iż mechanizm zaburzeń smaku jest niezależny od zaburzeń węchu w przebiegu COVID-19 (254, 314). Niezależnie jednak, czy zaburzenia smaku są pierwotne, czy wtórne do zaburzeń węchu, ich wartość w wykrywaniu zwiększonego ryzyka zakażenia wirusem SARS-CoV-2 jest podobna. Ich wrażliwość, swoistość lub negatywne i pozytywne wartości predykcyjne pozostają niezmiennie, nawet jeśli patomechanizm zaburzeń smaku wywodzi się z zaburzeń węchu.

W wielośrodkowym badaniu europejskim częstość subiektywnych zaburzeń smaku wynosiła 88% (315). Liczba ta jest wyższa niż od raportowanej w niniejszym badaniu i może wynikać z faktu, że populacja opisana przez Lechiena i wsp. uwzględniała również osoby starsze (do 77 lat) z chorobami współistniejącymi, które mogą również wpływać na odczuwanie smaku i powodować podwyższenie jego progu czuciowego. Co ciekawe, rozpowszechnienie dysgeusji zgłaszane w populacjach europejskich i amerykańskich wydaje się być znacznie wyższe niż w chińskiej (5,6%), jak podają Mao i wsp. (316) oraz koreańskiej (15,3%), jak donoszą Lee i wsp. (317).

W jednym z badań, które obiektywnie oceniało dysfunkcję smakową u pacjentów z COVID-19, stosowano tylko pojedyncze stężenia poszczególnych smaków (247). Pacjentów w tym badaniu uznawano za cierpiących na ageuzję, jeśli nie byli w stanie zidentyfikować żadnego z następujących czterech smaków: słodkiego, słonego, kwaśnego i gorzkiego.

Częstość występowania ageuzji według tej definicji wynosiła 1,4% badanych, natomiast jedynie 51,4% pacjentów trafnie zidentyfikowało wszystkie smaki. Badanie to nie miało grupy kontrolnej. W związku z powyższym oraz ze względu na różnice w zastosowanych testerów smakowych, trudno jest porównać wyniki przytaczanego badania z niniejszą pracą.

Wydaje się, że brak węchu i zaburzenia smaku są kluczowymi objawami odróżniającymi COVID-19 od zakażeń grypopodobnych- utrata węchu lub smaku nie jest charakterystycznym objawem infekcji grypopodobnych, jednak w literaturze opisano osłabienie odczuwania smaku towarzyszące tym infekcją (318). Niemniej jednak dotychczasowe doniesienia pokazują, że pandemia COVID-19 znacznie zwiększyła częstość występowania zaburzeń chemosensorycznych, szczególnie wśród osób młodych (319).

Jako ciekawostkę nadmienić można ponadto, iż opisywano także przypadki zaburzeń węchu i smaku po podaniu szczepionki przeciwko COVID-19. Lechien i wsp. opisali 6 takich przypadków (320). Wcześniej podobne przypadki występowały po szczepionkach przeciwko grypie (321, 322).

Pomimo, iż w znakomitej większości pacjenci z ujemnym wynikiem SARS-CoV-2 i objawami grypopodobnymi nie zgłaszali objawów zaburzenia smaku, z obserwacji autora wynika, że w obiektywnych pomiarach smaku można jednak wykryć delikatne odstępstwa od normy w odczuwaniu smaków – w szczególności słodkiego. Z tego powodu autor nie uważa pojedynczego testu smaku za wystarczającego do użycia jako test przesiewowy w kierunku COVID-19, pomimo że test słodkiego smaku przy stężeniu sacharozy 40 mg/ml (Słodki 1) miał czułość 71%. W tabeli 6 wskazano, że połączenie testu smaku Słodki 1 z kwestionariuszem składającym się z trzech pytań (czy wystąpiły subiektywne zaburzenia smaku, zapachu lub gorączka w ciągu ostatnich 30 dni), czyli stworzenie wtórego modelu który autor nazwał Testem Przesiewowym, zwiększa czułość badania do 94%, a negatywną wartość predykcyjną (NPV) do 87%. Wyniki te są zbliżone do tych, które uzyskali Huart i wsp, tj. 100% czułość i 60% swoistość testu słodkiego smaku w rozpoznaniu COVID-19 (252). Czuość 94% w niniejszym badaniu wydaje się być wartością akceptowalną w porównaniu z czułością badania CT w diagnostyce COVID-19 wynoszącą 97% i ujemną wartością predykcyjną (NPV) wynoszącą 83% (143). Warto podkreślić także, że prezentowane przez autora wartości diagnostycznych testów są znacznie bardziej czułe ale mniej swoiste niż raportowane w literaturze wyniki bazujące na kwestionariuszach zaburzeń smaku i węchu- w badaniu

Benezit i wsp. czułość – 42%, swoistość – 95% (323) zaś w badaniu Wee i wsp. czułość – 99% a swoistość – 27% (324).

Należy jednocześnie podkreślić, że połączenie testera Słodki 1 z Kwestionariuszem, czyli stworzenie modelu wtórnego nazwanego Testem Przesiewowym, obniża pole pod krzywą (ROC AUC) z 0,82 dla samego Kwestionariusza do 0,75 dla Testu Przesiewowego. Oznacza to więc pogorszenie jakości testu z poziomu dobrego do akceptowalnego (325) przy jednoczesnym zwiększeniu czułości badania z 77% do 94%. Zdaniem autora jednak, w niektórych przypadkach takie działanie może być uzasadnione. Zgodnie z badaniem Gostic i wsp. (326) jedynie od 5 do 25% podróżnych zgłasza w trakcie kontroli kontakt z patogenem, jeśli taki ich zdaniem nastąpił. Z drugiej zaś strony standardowo stosowane w miejscach publicznych termometry podczerwone cechują się niezbyt wysoką czułością w wykrywaniu gorączki rzędu 60-88% (327-329). To zaś rodzi potrzebę opracowania obiektywnego testu, o jak największej czułości, który nie będzie bazować jedynie na raportowanych przez pacjenta objawach. Otrzymane w niniejszym badaniu wartości są podobne do podawanych w literaturze dla predykcji COVID-19 m.i. przez Gerkin i wsp. (330): subiektywne zaburzenia węchu ROC AUC=0,71, subiektywne zaburzenia smaku ROC-AUC=0.64-0.65. Adorni i wsp. stosując kombinację objawów: subiektywne zaburzenia węchu i smaku, ból mięśni, kaszel i gorączka uzyskali test z ROC-AUC=0,81. Interesujący wynik swojego badania przedstawili Calvo- Henriquez i wsp. (331). W teście zaburzeń węchu bazujących na alkoholu etylowym uzyskali ROC-AUC=0,75.

Zimmerman i wsp. proponują zastosowanie drzewa decyzyjnego, w którym poza oceną subiektywnego zaburzenia smaku i węchu, badacze pytali dodatkowo o kontakt z osobą o potwierdzonym zakażeniu SARS-CoV-2 a także o ból gardła. Drzewo to miało czułość 69% i swoistość 78%, pozytywną wartość predykcyjną (PPV) 20% i negatywną wartość predykcyjną (NPV) 97% (332). Interesującym zdaje się fakt, że wśród pacjentów objawowych, które miały bliski kontakt z osobą zakażoną, bez zastosowania środków ochronnych, jedynie 21% okazało się zakażonym wirusem SARS-CoV-2.

W innym badaniu ankietowym Bidkar i wsp. ocenili wartości predykcyjne subiektywnych zaburzeń smaku oraz zaburzeń węchu w diagnostyce COVID-19 na dużej grupie 832 pacjentów z Indii, przebywających na kwarantannie z podejrzeniem zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (333). Po wykonaniu testu PCR okazało się, że siedemdziesięciu

sześciu pacjentów ma pozytywny wynik badania. Wartość diagnostyczna subiektywnych zaburzeń w badanej populacji prezentowała się następująco: czułość – 92,1%, swoistość – 32,8%, PPV – 14,3%, NPV – 97%. Dla zaburzeń smaku wartości diagnostyczne były następujące: czułość – 81,6%, swoistość – 42,1 %, PPV – 14,7%, NPV – 14,7%. Jak można zauważyć, zaburzenia smaku były mniej czułe – za to bardziej swoiste niż zaburzenia węchu. Przełożyło się to na nieznacznie większą wartość PPV i niższą wartość NPV.

Roland i wsp. w amerykańskim badaniu zbadali wartości predykcyjne zaburzeń smaku i węchu. Dodatkowo ocenili także, jak zmieniają się wartości czynników predykcyjnych przy włączeniu do analizy dodatkowych objawów COVID-19 (334). Zaburzenia węchu i smaku analizowane pojedynczo prezentują czułość rzędu 70% i swoistość – 73% z wartością AUC=0,71. Kiedy analizowane są łącznie z zaburzeniami smaku i węchu, także inne objawy COVID-19, takie jak ból mięśni, gorączka, ból gardła i duszność, uzyskiwany jest wzrost ROC AUC do 0,82 kosztem niższej czułości – 56% i wyższej swoistości – 89%.

W innym badaniu kwestionariuszowym, gdzie oceniano wyłącznie zaburzenia węchu, czułość tego objawu w diagnostyce COVID-19 wyniosła 65%, swoistość – 97%, PPV – 63% a NPV – 97% (335). Badanie to przeprowadzone zostało przy użyciu kwestionariuszy na populacji 500 pacjentów zgłaszających objawy przeziębienia i zgłaszających się do punktu diagnostyki koronawirusa szpitala w Dreźnie w Niemczech. Spośród pięciuset pacjentów który wypełnili kwestionariusz 34 okazało się SARS-CoV-2 dodatnich natomiast pozostałe 466 osób było ujemne. Większość pacjentów raportowało łączną utratę zapachu i smaku lub jedynie utratę węchu. Jeden pacjent zgłosił izolowaną utratę smaku z zachowanym węchem.

Proponowany przez autora test przesiewowy może być stosowany do badań przesiewowych COVID-19 w dużych populacjach. Taki test może być również stosowany wielokrotnie (np. raz w tygodniu), aby zapewnić szybką identyfikację osób zagrożonych. Może być on wykonywany jako test ambulatoryjny lub test do samodzielnego użytku w domu. Chociaż autor nie porównał wyników testu wykonywanego samodzielnie z testem wykonywanym przez operatora medycznego, badania wskazują na porównywalną skuteczność testów smaku wykonywanych samodzielnie i przez personel medyczny (336).

Proponowany test przesiewowy mógłby być również stosowany w krajach rozwijających się, w których dostępność badań genetycznych (RT-PCR dla SARS-CoV-2) lub

serologicznych (przeciwciała) jest niewielka, dla pracowników służby zdrowia lub oddziałów ratunkowych jako pierwszy, szybki i łatwy krok w celu ustalenia, czy pacjent jest prawdopodobnie zakażony wirusem SARS-CoV-2. Jak zaobserwowano w badaniu przeprowadzonym w Nowym Jorku tylko 34% pacjentów, u których wystąpiła anosmia i/lub zaburzenia smaku, zostało przebadanych na obecność COVID-19 na SOR, spośród których 72% badanych okazało się pozytywnych (246).

Chociaż czułość i negatywna wartość predykcyjna proponowanego testu są wysokie, jego swoistość wynosi tylko 55% przy pozytywnej wartości predykcyjnej – 75%. Wydaje się, że jest to dopuszczalne w przypadku testu przesiewowego, chociaż wartość wydaje się zbyt niska, aby tak skonstruowany test można było wykorzystać jako wiarygodne narzędzie diagnostyczne. Z tego powodu autor zaproponował dodatkowy model pochodny (test diagnostyczny). Ten test łączy trzy testy smaku, które w badaniu zostały błędnie zidentyfikowane tylko przez pacjentów z COVID-19: Słony 1, Słony 2 i Słodki 3. Test ten wykazał 100% swoistość i 100% pozytywną wartość prognostyczną (PPV) w diagnozowaniu COVID-19 (tabela 6). Pozytywny wynik takiego testu mógłby stanowić podstawę do skierowania pacjentów na kwarantannę w rejonach o ograniczonej dostępności testów genetycznych, antygenowych lub serologicznych.

Alternatywą do proponowanego przez autora testu bazującego na spożywczych substancjach smakowych, czyli tak zwanej gustometri mogłoby być badanie elektrogustometryczne, polegające na wyznaczaniu progów czucia smaku na drodze drażnienia języka prądem elektrycznym. Elektrogustometria była wykorzystywana dotychczas w badaniach utraty smaku, w przebiegu rozmaitych schorzeń i zabiegów takich jak chirurgia ucha środkowego (337), tonsillektomia (338), resekcja zębów mądrości (339). W klasycznym badaniu elektrogustometrycznym badacz musi polegać na subiektywnej percepcji smaku przez pacjenta. Opracowane zostały jednak metody obiektywizacji pomiaru bazujące na smakowych potencjałach wywołanych a nawet zastosowaniu PET (pozytronowej tomografii emisyjnej) czy fMRI (funkcjonalnego rezonansu magnetycznego mózgu) (340). Część badań wskazuje, że elektrogustometria może mieć niską wartość diagnostyczną w badaniach przesiewowych zaburzeń smaku (341, 342), z drugiej jednak strony, badacze wskazują na istotną korelację wyników badania elektrogustometrycznego z testami paskowymi smaku, przynajmniej w niektórych obszarach języka (343). Pomimo, iż część badaczy postuluje potrzebę oceny

przydatności elektrogustometrii w diagnostyce zaburzeń smaku w COVID-19 (344), do tej pory nie przeprowadzono dużych badań klinicznych oceniających jej przydatność w tym schorzeniu.

Niniejsze badanie ma szereg ograniczeń. Stosunkowo mała próba wskazuje na potrzebę walidacji wyników na większej populacji, co planowane jest w przyszłości. Kolejnym ograniczeniem badania było zastosowanie tylko kilku lub nawet pojedynczego (dla smaku gorzkiego) stężenia danej substancji smakowej. Jeszcze innym ograniczeniem było zastosowanie wyłącznie jednej substancji smakowej przy ocenie zaburzeń danego smaku. Jak pokazują wyniki niniejszego badania, zakażenie wirusem SARS-CoV-2 powoduje u niektórych chorych całkowity zanik odczuwania poszczególnych smaków, u znakomitej większości jednak, jedynie podwyższenie progu odczuwania smaków. Brak zastosowania wielu zbliżonych stężeń substancji smakowych nie pozwala na wyznaczenie dokładnych progów smakowych przy których dochodzi do zaburzeń smaku, charakterystycznych dla zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Ograniczenia te wynikały ze specyfiki badania oraz czasu, w którym zostało ono przeprowadzone. Badanie realizowane było w kwietniu i maju 2020 roku, czyli na początku pandemii COVID-19 w Polsce. W tamtym czasie wirus SARS-CoV-2 nie był jeszcze na tyle dobrze poznany, jak w chwili pisania niniejszej pracy – a środki ochrony osobistej, nie tak powszechnie dostępne i reglamentowane każdemu pracownikowi ochrony zdrowia. W związku z powyższym opracowano badanie, które pozwoliło na zminimalizowanie kontaktu między badaczem a osobami zakażonymi, jednak ograniczyło możliwość dokładnej oceny zaburzeń smaku w przebiegu COVID-19.

Za ograniczenie badania można także uznać brak przeprowadzenia szczegółowej oceny zmysłu węchu wśród uczestników badania. Jak wiadomo, zmysł ten powiązany jest ściśle ze smakiem i przebadanie zdolności identyfikacji zapachu pozwoliłoby lepiej zrozumieć zaburzenia smaku. Niemniej jednak, jak przedstawiono we wstępie i dyskusji, wydaje się, że w COVID-19 mechanizm zaburzeń smaku jest przynajmniej w części niezależny od zaburzeń węchu.

Za kolejne ograniczenie można uznać fakt, że większość osób w badanej i kontrolnej grupie niniejszego badania stanowili mężczyźni. Wydaje się jednak, że mężczyźni zakażeni SARS-CoV-2 zdają się rzadziej prezentować zaburzenia smaku niż kobiety (315, 345), więc testy bazujące na metodologii niniejszej pracy, mogą być jeszcze bardziej czułe u kobiet oraz w populacji ogólnej.

Dodatkowym ograniczeniem opisywanego badania jest dokładność testów RT-PCR, które są złotym standardem w diagnostyce COVID-19. W celu potwierdzenia wyników testu PCR w niniejszym badaniu każdy pacjent dwukrotnie przeszedł test w kierunku zakażenia wirusem SARS-CoV-2. W jednym przypadku pacjent, który początkowo otrzymał negatywną diagnozę, uzyskał następnie potwierdzony pozytywny wynik. Na koniec należy wspomnieć, że zaburzenia smaku i/lub węchu mogą wciąż utrzymywać się u pacjentów, u których w badaniu PCR uzyskano ujemny wynik SARS-CoV-2 (346).

Mocną stroną badania jest fakt, iż poza badaniem ankietowym przeprowadzono obiektywne testy smaku za pomocą testerów smakowych. Inną mocną stroną tego badania jest to, że zostało przeprowadzone na młodej i poza tym zdrowej populacji żyjącej w podobnym środowisku oraz z porównywalną grupą kontrolną.

10. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Obecnie według WHO złotym standardem wykrywania zakażenia SARS-CoV-2 jest badanie wymazu z jamy nosowo-gardłowej RT-PCR. Niemniej jednak, czułość RT-PCR jako metody przesiewowej może zostać dodatkowo ograniczona przez nieprawidłowo wykonane wymazy. Koszt tej metody w przypadku badań przesiewowych na dużą skalę jest wysoki, logistyka związana z dostarczaniem próbek do laboratoriów referencyjnych jest skomplikowana, a czas oczekiwania na wyniki może być bardzo długi. Tomografia komputerowa klatki piersiowej wykazuje wysoką czułość i swoistość dla COVID-19, ale szereg wad, w tym jego koszt i duże obciążenie radiologiczne podczas zabiegu, wyklucza to badanie jako możliwy test przesiewowy. Obie metody nie są dostępne dla szerszej populacji w wielu krajach – w szczególności rozwijających się.

Pomimo, iż szczepienia na SARS-CoV-2 już się rozpoczęły, dalej jedyną metodą, która może obecnie kontrolować pandemię, jest badanie szerszej populacji pod kątem objawowych, oligosymptomatycznych i bezobjawowych nosicieli SARS-CoV-2, izolowanie zakażonych osób i rozpoczęcie wczesnego leczenia pacjentów, u których wystąpią objawy COVID-19. W tym celu potrzebna jest niedroga, prosta, szybka i czuła metoda przesiewowa. Jak pokazują badania Vaira i wsp. testy smaku są metodą diagnostyczną, która może być wykonywana samodzielnie przez pacjenta, bez konieczności angażowania do tego badania personelu medycznego (336). Zanim przesiewowe systemy antygenowe lub molekularne zostaną wdrożone na skalę masową, system oparty na testach smaku mógłby usprawnić badania przesiewowe w kierunku COVID-19, poprzez identyfikację potencjalnych nosicieli SARS-CoV-2 i kierowanie ich do dalszej diagnostyki. Tego typu system mógłby być wykorzystywany jako podstawa do kierowania pacjentów na kwarantannę w przypadku ograniczonej dostępności testów genetycznych lub antygenowych, w szczególności w obliczu trwającej obecnie trzeciej fali pandemii SARS-CoV-2.

Przeprowadzony eksperyment pozwolił w sposób obiektywny ocenić wpływ wirusa SARS-CoV-2 na odczuwanie smaków, u pacjentów we wczesnym okresie po zakażeniu. Na tej podstawie stworzono model predykcyjny bazujący na obiektywnych testach smaku. Podjęte badania były dodatkowo próbą porównania skuteczności stworzonego modelu do modeli bazujących na subiektywnych objawach COVID-19. Wnioski płynące z przeprowadzonych eksperymentów stanowią odpowiedź na wyznaczone na wstępie cel pracy.

- I. Zakażenie wirusem SARS-CoV-2 wpływa na percepcję smaków, upośledzając selektywnie odczuwanie smaku słodkiego oraz słonego. Zaburzenia te mają charakter hipogeusii zależnej od stężenia substancji smakowej. Całkowita ageusia w grupie chorych COVID-19 jest bardzo rzadka.
- II. Pojedynczym testerem smaku o najwyższej wartości diagnostycznej zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (najwyższa wartość ROC-AUC), wśród testerów smaku, a zarazem najwyższej czułości, wśród testerów smaku, był tester smaku słodkiego o stężeniu sacharozy 40 mg/ml.
- III. Modelem predykcyjnym bazującym na obiektywnych testach smaków, o najwyższej czułości był model składający się z kwestionariusza medycznego dotyczącego subiektywnych objawów COVID-19 oraz badania testerem smakowym Słodki 1 (stężenie sacharozy 40 mg/ml) – model przesiewowy.
- IV. Modelem predykcyjnym bazującym na obiektywnych testach smaków, o najwyższej swoistości był model składający się z badania testerami smakowymi: Słony 1 (stężenie chlorku sodu 13,5 mg/ml), Słony 2 (stężenie chlorku sodu 17 mg/ml), Słodki 3 (stężenie sacharozy 106,4 mg/ml) – model diagnostyczny.
- V. Wartość diagnostyczna (wartość ROC-AUC) modelu predykcyjnego bazującego na subiektywnych symptomach COVID-19 (tzw. kwestionariusz medyczny) okazała się nieznacznie wyższa niż modeli predykcyjnych bazujących na obiektywnych testach smaku. W sytuacjach epidemiologicznych wymagających obiektywizacji badań przesiewowych wskazane może być użycie obiektywnych testów smaku niezależnie lub łącznie z kwestionariuszem medycznym.

11. SUPPLEMENT

Identyfikacje poszczególnych testerów smaku przez uczestników badania przedstawiono w tabeli 9 – grupa badana, SARS-CoV-2 dodatnia oraz tabeli 10 – grupa kontrolna, SARS-CoV-2 ujemna. Każdy uczestnik (w grupie badanej, SARS-CoV-2 dodatniej – 52 osoby, w grupie kontrolnej, SARS-CoV-2 ujemnej – 36 osoby) wykonały wszystkie, dziewięć testów smakowych następującymi testerami smaku: Kwaśny 1, Słodki 1, Słony 1, Kwaśny 2, Słodki 2, Słony 2, Gorzki 1, Słodki 3, Słony 3.

Tabela 9. Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów z grupy badanej (SARS-CoV-2 dodatniej).

Wiek	Płeć	Palenie e-papierosów	Palenie papierosów	Gorączka	Sub. zab. smaku	Sub. zab. węchu	Słony 3	Słodki 3	Gorzki 1	Słony 2	Słodki 2	Kwaśny 2	Słony 1	Słodki 1	Kwaśny 1	Numer pacjenta
20	M	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
24	M	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
19	M	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
20	M	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	4
23	M	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	5
23	M	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	6
25	F	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
22	M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	8
19	M	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	9
26	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	10
24	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	11
21	M	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	12
24	M	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
19	M	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	14
20	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
21	M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	16
22	M	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	17
21	M	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	18
21	M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
23	M	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	20
22	M	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	21
22	M	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	22
24	M	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	23
20	M	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	24
23	M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	25
22	M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	26
20	M	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	27
21	M	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	28
22	M	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	29

Tabela 9. Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów z grupy badanej (SARS-CoV-2 dodatniej) – *ciąg dalszy*.

Numer pacjenta	Kwaśny 1	Słodki 1	Słony 1	Kwaśny 2	Słodki 2	Słony 2	Gorzki 1	Słodki 3	Słony 3	Sub. zab. węchu	Sub. zab. smaku	Gorączka	Palenie papierosów	Palenie e-papierosów	Płeć	Wiek
30	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	M	21
31	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	M	22
32	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	M	23
33	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	M	20
34	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	M	21
35	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	M	21
36	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	20
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	19
38	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	M	22
39	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	M	22
40	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	M	22
41	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	M	23
42	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	M	22
43	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
44	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	M	23
45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	M	22
46	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	19
47	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	M	22
48	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	M	24
49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	M	26
50	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	M	20
51	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	M	22
52	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	M	20

Adnotacja. Sub. zab. węchu – subiektywne zaburzenia węchu; Sub. zab. smaku – subiektywne zaburzenia smaku.

Dla zmiennych: Kwaśny 1, Słodki 1, Słony 1, Kwaśny 2, Słodki 2, Słony 2, Gorzki 1, Słodki 3, Słony 3 wskazanie 0 oznacza błędną identyfikację, wskazanie 1 oznacza prawidłową identyfikację; dla zmiennych: subiektywne zaburzenia węchu, subiektywne zaburzenia smak, gorączka, palenie papierosów, palenie e-papierosów, wskazanie 0 oznacza brak występowania czynnika, 1 oznacza występowanie czynnika;

Tabela 10. Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów z grupy kontrolnej (SARS-CoV-2 ujemnej).

Wiek	Płeć	Palenie e-papierosów	Palenie papierosów	Gorączka	Sub. zab. smaku	Sub. zab. węchu	Słony 3	Słodki 3	Gorzki 1	Słony 2	Słodki 2	Kwaśny 2	Słony 1	Słodki 1	Kwaśny 1	Numer pacjenta
21	M	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
24	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2
20	F	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
19	F	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
21	M	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	5
22	M	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	6
21	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
19	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
21	M	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	9
22	M	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	10
19	M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	11
20	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
20	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	13
19	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	14
21	M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
24	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	16
20	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	17
20	M	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	18
20	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	19
20	M	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	20
20	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	21
20	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	22
20	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	23
23	M	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	24
21	M	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	25

Tabela 10. Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów badania z grupy kontrolnej (SARS-CoV-2 ujemnej) – *ciąg dalszy*.

Numer pacjenta	Kwaśny 1	Słodki 1	Słony 1	Kwaśny 2	Słodki 2	Słony 2	Gorzki 1	Słodki 3	Słony 3	Sub. zab. węchu	Sub. zab. smaku	Gorączka	Palenie papierosów	Palenie e-papierosów	Płeć	Wiek
26	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	M	20
27	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
28	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	M	22
29	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
30	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	M	22
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	22
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	M	20
34	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
35	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	21
36	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	M	0

Adnotacja. Sub. zab. węchu – subiektywne zaburzenia węchu; Sub. zab. smaku – subiektywne zaburzenia smaku.

Dla zmiennych: Kwaśny 1, Słodki 1, Słony 1, Kwaśny 2, Słodki 2, Słony 2, Gorzki 1, Słodki 3, Słony 3 wskazanie 0 oznacza błędną identyfikację, wskazanie 1 oznacza prawidłową identyfikację; dla zmiennych: subiektywne zaburzenia węchu, subiektywne zaburzenia smak, gorączka, palenie papierosów, palenie e-papierosów, wskazanie 0 oznacza brak występowania czynnika, 1 oznacza występowanie czynnika.

12. SPIS TABEL I RYCIN

Spis tabel:

Tabela 1.	Zatwierdzone do użycia szczepionki przeciw SARS-CoV-2.	25
Tabela 2.	Szczególnie niebezpieczne warianty wirusa SARS-CoV-2 (ang. Variants of Concern).	30
Tabela 3.	Dane demograficzne oraz objawy podmiotowe uczestników badania	49
Tabela 4.	Porównanie znamienne statystycznych objawów przedmiotowych zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.	51
Tabela 5.	Porównanie wybranych, nieznamiennych statystycznie, objawów przedmiotowych zakażenia wirusem SARS-CoV-2 w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.	52
Tabela 6.	Porównanie wyników testerów smaku słodkiego i gorzkiego w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.	53
Tabela 7.	Porównanie wyników testerów smaku słonego i kwaśnego w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.	54
Tabela 8.	Wartość diagnostyczna modeli predykcyjnych: swoistość, czułość, dodatnia wartość predykcyjna – PPV (ang. positive predictive value), ujemna wartość predykcyjna – NPV (ang. negative predictive value), ROC-AUC – pole pod krzywą ROC (ang. area under the receiver operating characteristic curve) dla wielkości próby n=88.	56
Tabela 9	Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów z grupy badanej (SARS-CoV-2 dodatniej).	80-81
Tabela 10.	Wyniki poszczególnych testów smakowych oraz odpowiedzi do kwestionariusza osobowego pacjentów z grupy kontrolnej (SARS-CoV-2 ujemnej).	82-83

Spis rycin:

Rycina 1.	Częstość występowania ageusii i anosmii w porównaniu do innych symptomów COVID-19.	34
Rycina 2.	Rozpowszechnienie zaburzeń smaku i zapachu u pacjentów COVID-19 w zależności od regionu świata.	38
Rycina 3.	Schemat badania i wyniki prognostyczne modeli pochodnych.	45
Rycina 4.	Krzywe ROC dla pierwotnych modeli predykcyjnych (Kwestionariusz, Słodki 1) o największym polu pod krzywą (AUC) oraz wtórnych modeli predykcyjnych (Test przesiewowy, Test diagnostyczny).	57

13. BIBLIOGRAFIA

1. Tyrrell DAJ, Bynoe ML. Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. *BMJ*. 1965;1(5448):1467-70.
2. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;17(3):181-92.
3. Valencia DN. Brief Review on COVID-19: The 2020 Pandemic Caused by SARS-CoV-2. *Cureus*. 2020;12(3):e7386.
4. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39(6):1011-9.
5. World Health Organization. Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Dostęp 01.09.2021.
6. World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>. Dostęp 01.09.2021.
7. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng P-Y, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(9):687-95.
8. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en>. Dostęp 01.09.2021.
9. Centers for Disease Control and Prevention. 2014-2016 Ebola Outbreak in West Africa. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html>. Dostęp 01.09.2021.

10. World Health Organization. Global HIV, Hepatitis and STIs Programmes. <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/data-use/hiv-data-and-statistics>. Dostęp 01.09.2021.
11. Centers for Disease Control and Prevention. 1918 Pandemic (H1N1 virus). <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-pandemic-h1n1.html>. Dostęp 01.09.2021.
12. Mordechai L, Eisenberg M, Newfield TP, Izdebski A, Kay JE, Poinar H. The Justinianic Plague: An inconsequential pandemic? *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(51):25546-54.
13. DeLeo FR, Hinnebusch BJ. A plague upon the phagocytes. *Nat Med*. 2005;11(9):9278.
14. Frith J. The History of Plague – Part 1. The Three Great Pandemics. *Journal of Military and Veterans' Health*. 2012;20(2):11-16.
15. Liu J, Liao X, Qian S, Yuan J, Wang F, Liu Y, et al. Community Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Shenzhen, China, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(6).
16. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020;395(10223):514-23.
17. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
18. Burke RM, Midgley CM, Dratch A, Fenstersheib M, Haupt T, Holshue M, et al. Active Monitoring of Persons Exposed to Patients with Confirmed COVID-19 — United States, January–February 2020. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2020;69(9):245-6.
19. Hamner L, Dubbel P, Capron I, Ross A, Jordan A, Lee J, et al. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice — Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2020;69(19):606-10.

20. Ghinai I, McPherson TD, Hunter JC, Kirking HL, Christiansen D, Joshi K, et al. First known person-to-person transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the USA. *The Lancet*. 2020;395(10230):1137-44.
21. Pung R, Chiew CJ, Young BE, Chin S, Chen MIC, Clapham HE, et al. Investigation of three clusters of COVID-19 in Singapore: implications for surveillance and response measures. *The Lancet*. 2020;395(10229):1039-46.
22. Luo L, Liu D, Liao X-l, Wu X-b, Jing Q-l, Zheng J-z, et al. Modes of contact and risk of transmission in COVID-19 among close contacts. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.24.20042606
23. Mittal R, Ni R, Seo J-H. The flow physics of COVID-19. *Journal of Fluid Mechanics*. 2020;894.
24. Bourouiba L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions. *JAMA*. 2020;323(18):1837-1838.
25. Asadi S, Bouvier N, Wexler AS, Ristenpart WD. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? *Aerosol Science and Technology*. 2020;54(6):635-8.
26. Morawska L, Cao J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int* . 2020 Jun;139:105730.
27. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-7.
28. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, Ong SWX, Gum M, Lau SK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature Communications*. 2020; 11, 2800.

29. Guo Z-D, Wang Z-Y, Zhang S-F, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1583-91.
30. Barclay WS, Holmes AH, Bolt F, Mason S, Boshier PR, Kinross J, et al. Investigating SARS-CoV-2 surface and air contamination in an acute healthcare setting during the peak of the COVID-19 pandemic in London. *Clin Infect Dis.* 2020; Jul 8;ciaa905.
31. Ma J, Qi X, Chen H, Li X, Zhang Z, Wang H, et al. Exhaled breath is a significant source of SARS-CoV-2 emission. *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.05.31.20115154
32. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1831-3.e3.
33. Lee BU. Minimum Sizes of Respiratory Particles Carrying SARS-CoV-2 and the Possibility of Aerosol Generation. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(19).
34. Kim J-M, Chung Y-S, Jo HJ, Lee N-J, Kim MS, Woo SH, et al. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health and Research Perspectives.* 2020;11(1):3-7.
35. Park WB, Kwon N-J, Choi S-J, Kang CK, Choe PG, Kim JY, et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci.* 2020;35(7).
36. MacIntyre CR, Bourouiba L, Chughtai AA, de Silva C, Doolan C, Bahl P. Airborne or Droplet Precautions for Health Workers Treating Coronavirus Disease 2019? *The Journal of Infectious Diseases.* 2020 Apr 16;jiaa189.
37. Bourouiba L, Dehandschoewercker E, Bush John WM. Violent expiratory events: on coughing and sneezing. *Journal of Fluid Mechanics.* 2014;745:537-63.
38. Wei J, Li Y. Enhanced spread of expiratory droplets by turbulence in a cough jet. *Build Environ.* 2015;93:86-96.

39. Bourouiba L. A Sneeze. *N Engl J Med*. 2016;375(8).
40. William C. Hinds. *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*, 2nd Edition 1999. Wiley-Interscience.
41. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera VL, Morwitzer MJ, Creager HM, Santarpia GW, et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep*. 2020;10(1).
42. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):e238-e44.
43. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199-207.
44. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*. 2020;395(10225):689-97.
45. Ives AR, Bozzuto C. State-by-State estimates of R0 at the start of COVID-19 outbreaks in the USA. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.05.17.20104653.
46. Sanche S, Lin YT, Xu C, Romero-Severson E, Hengartner N, Ke R. High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1470-7.
47. Balcan D, Hu H, Goncalves B, Bajardi P, Poletto C, Ramasco JJ, et al. Seasonal transmission potential and activity peaks of the new influenza A(H1N1): a Monte Carlo likelihood analysis based on human mobility. *BMC Med*. 2009;7:45.

48. Andraesen V, Viboud C, Simonsen L. Epidemiologic characterization of the 1918 influenza pandemic summer wave in Copenhagen: implications for pandemic control strategies. *J Infect Dis.* 2008;197(2):270-8.
49. MacIntyre CR, Costantino V, Chen X, Segelov E, Chughtai AA, Kelleher A, et al. Influence of Population Immunosuppression and Past Vaccination on Smallpox Reemergence. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(4):646-53.
50. Anderson RM, May RM. Immunisation and herd immunity. *The Lancet.* 1990;335(8690):641-5.
51. Guerra FM, Bolotin S, Lim G, Heffernan J, Deeks SL, Li Y, et al. The basic reproduction number (R0) of measles: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases.* 2017;17(12):e420-e8.
52. Jin J-M, Bai P, He W, Wu F, Liu X-F, Han D-M, et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Frontiers in Public Health.* 2020;8.
53. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(5):756-9.
54. Ford N, Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2020 Sep; 17(9): e1003346.
55. Acuti Martellucci C, Flacco ME, Cappadona R, Bravi F, Mantovani L, Manzoli L. SARS-CoV-2 pandemic: An overview. *Adv Biol Regul.* 2020 Aug;77:100736.
56. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2020;8(5):475-81.

57. World Health Organization.. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases 2020 [https://www.who.int/publications-detail-redirect/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-\(-2019-ncov\)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020](https://www.who.int/publications-detail-redirect/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-(-2019-ncov)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020). Dostęp 01.09.2021.
58. Sun C, Zhai Z. The efficacy of social distance and ventilation effectiveness in preventing COVID-19 transmission. *Sustain Cities Soc.* 2020 Nov; 62: 102390.
59. Gupta MK, Lipner SR. Hand hygiene in preventing COVID-19 transmission. *Cutis.* 2020;105(5):233-4.
60. Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N Engl J Med.* 2021; 384:1412-1423
61. Shimabukuro TT, Cole M, Su JR. Reports of Anaphylaxis After Receipt of mRNA COVID-19 Vaccines in the US—December 14, 2020-January 18, 2021. *JAMA.*2021;325(11):1101-1102.
62. Wouters OJ, Shadlen KC, Salcher-Konrad M, Pollard AJ, Larson HJ, Teerawattananon Y, et al. Challenges in ensuring global access to COVID-19 vaccines: production, affordability, allocation, and deployment. *The Lancet.* 2021;397(10278):1023-34.
63. Duke Global Health Innovation Center. The Launch and Scale Speedometer 2021 <https://launchandscalefaster.org/COVID-19>. Dostęp 01.09.2021.
64. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, Loeb M, Gong MN, Fan E, et al. Surviving Sepsis Campaign: Guidelines on the Management of Critically Ill Adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Crit Care Med.* 2020;48(6):e440-e69.
65. Jonmarker S, Hollenberg J, Dahlberg M, Stackelberg O, Litorell J, Everhov ÅH, et al. Dosing of thromboprophylaxis and mortality in critically ill COVID-19 patients. *Crit Care .* 2020 Nov 23;24(1):653.

66. Porter DP, Weidner JM, Gomba L, Bannister R, Blair C, Jordan R, et al. Remdesivir (GS-5734) Is Efficacious in Cynomolgus Macaques Infected With Marburg Virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020;222(11):1894-901.
67. Goletti D, Cantini F. Baricitinib Therapy in Covid-19 Pneumonia — An Unmet Need Fulfilled. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(9):867-9.
68. Investigators R-C, Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, Rowan KM, Nichol AD, et al. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Apr 22;384(16):1491-1502.
69. Simonovich VA, Burgos Pratz LD, Scibona P, Beruto MV, Vallone MG, Vázquez C, et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med* 2021; 384:619-629.
70. Liu STH, Lin H-M, Baine I, Wajnberg A, Gumprecht JP, Rahman F, et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat Med*. 2020;26(11):1708-13.
71. Janiaud P, Axfors C, Schmitt AM, Gloy V, Ebrahimi F, Hepprich M, et al. Association of Convalescent Plasma Treatment With Clinical Outcomes in Patients With COVID-19. *JAMA*. 2021;325(12):1185-1195.
72. Chatterjee K, Wu C-P, Bhardwaj A, Siuba M. Steroids in COVID-19: An overview. *Cleve Clin J Med* . 2020 Aug 20. Online ahead of print.
73. Geng S, Mei Q, Zhu C, Yang T, Yang Y, Fang X, et al. High flow nasal cannula is a good treatment option for COVID-19. *Heart Lung*. 2020;49(5):444-5.
74. Meng L, Qiu H, Wan L, Ai Y, Xue Z, Guo Q, et al. Intubation and Ventilation amid the COVID-19 Outbreak. *Anesthesiology*. 2020;132(6):1317-32.

75. Barbaro RP, MacLaren G, Boonstra PS, Iwashyna TJ, Slutsky AS, Fan E, et al. Extracorporeal membrane oxygenation support in COVID-19: an international cohort study of the Extracorporeal Life Support Organization registry. *The Lancet*. 2020;396(10257):1071-8.
76. Grillo F, Barisione E, Ball L, Mastracci L, Fiocca R. Lung fibrosis: an undervalued finding in COVID-19 pathological series. *Lancet Infect Dis*. 2021 Apr; 21(4): e72.
77. Cypel M, Keshavjee S. When to consider lung transplantation for COVID-19. *Lancet Respir Med*. 2020 Oct; 8(10): 944–946.
78. Helms J, Kremer S, Merdji H, Schenck M, Severac F, Clere-Jehl R, et al. Delirium and encephalopathy in severe COVID-19: a cohort analysis of ICU patients. *Critical Care*. 2020;24(1).
79. Wei WE, Li Z, Chiew CJ, Yong SE, Toh MP, Lee VJ. Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 — Singapore, January 23–March 16, 2020. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2020;69(14):411-5.
80. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med*. 2020;382(22):2081-90.
81. Böhmer MM, Buchholz U, Corman VM, Hoch M, Katz K, Marosevic DV, et al. Investigation of a COVID-19 outbreak in Germany resulting from a single travel-associated primary case: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(8):920-8.
82. Aguilar JB, Faust JS, Westafer LM, Gutierrez JB. A Model Describing COVID-19 Community Transmission Taking into Account Asymptomatic Carriers and Risk Mitigation. *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.18.20037994.
83. Huang L-S, Li L, Dunn L, He M. Taking account of asymptomatic infections: A modeling study of the COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship. *PLoS One* . 2021 Mar 16;16(3):e0248273.

84. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Leeftang MMG, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jul 7;7(7):CD013665.
85. Cheng Y, Cheng G, Chui CH, Lau FY, Chan PK, Ng MH, et al. ABO blood group and susceptibility to severe acute respiratory syndrome. *JAMA*. 2005;293(12):1450-1.
86. Latz CA, DeCarlo C, Boitano L, Png CYM, Patell R, Conrad MF, et al. Blood type and outcomes in patients with COVID-19. *Ann Hematol*. 2020;99(9):2113-8.
87. Wong SF, Chow KM, Leung TN, Ng WF, Ng TK, Shek CC, et al. Pregnancy and perinatal outcomes of women with severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;191(1):292-7.
88. Fenizia C, Biasin M, Cetin I, Vergani P, Mileto D, Spinillo A, et al. Analysis of SARS-CoV-2 vertical transmission during pregnancy. *Nat Commun*. 2020;11(1):5128.
89. Saccone G, Florio A, Aiello F, Venturella R, De Angelis MC, Locci M, et al. Psychological impact of coronavirus disease 2019 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(2):293-5.
90. Moyer CA, Compton SD, Kaselitz E, Muzik M. Pregnancy-related anxiety during COVID-19: a nationwide survey of 2740 pregnant women. *Arch Womens Ment Health*. 2020 Dec;23(6):757-765.
91. Dunkel Schetter C. Psychological science on pregnancy: stress processes, biopsychosocial models, and emerging research issues. *Annu Rev Psychol*. 2011;62:531-58.
92. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020;370:m3320.

93. Matar R, Alrahmani L, Monzer N, Debiane LG, Barbari E, Fares J, et al. Clinical Presentation and Outcomes of Pregnant Women with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* . 2021 Feb 1;72(3):521-533.
94. Reale SC, Fields KG, Lumbreras-Marquez MI, King CH, Burns SL, Huybrechts KF, et al. Association Between Number of In-Person Health Care Visits and SARS-CoV-2 Infection in Obstetrical Patients. *JAMA*. 2020;324(12):1210-2.
95. Ahmed I, Azhar A, Eltaweel N, Tan BK. First COVID-19 maternal mortality in the UK associated with thrombotic complications. *Br J Haematol*. 2020;190(1):e37-e8.
96. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2003;16(2):153-68.
97. Ahmed I, Quinn L, Tan BK. COVID-19 and the ABO blood group in pregnancy: A tale of two multiethnic cities. *Int J Lab Hematol* . 2021 Feb;43(1):e45-e47.
98. Gao YJ, Ye L, Zhang JS, Yin YX, Liu M, Yu HB, et al. Clinical features and outcomes of pregnant women with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):564.
99. Mantovani A, Rinaldi E, Zusi C, Beatrice G, Saccomani MD, Dalbeni A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children and/or adolescents: a meta-analysis. *Pediatr Res*. 2021 Mar;89(4):733-737.
100. Patel NA. Pediatric COVID-19: Systematic review of the literature. *Am J Otolaryngol*. 2020;41(5):102573.
101. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA*. 2020;323(13):1239-1242.
102. Statista. Distribution of Coronavirus cases in Italy as of August 11, 2020, by age group. <https://www.statista.com/statistics/1103023/coronavirus-cases-distribution-by-age-group-italy/>. Dostęp 11.08.2020.

103. Statista. Age distribution of coronavirus (COVID-19) cases in South Korea as of August 21, 2020. <https://www.statista.com/statistics/1102730/south-korea-coronavirus-cases-by-age/>. Dostęp 22.08.2020.
104. Posfay-Barbe KM, Wagner N, Gauthey M, Moussaoui D, Loevy N, Diana A, et al. COVID-19 in Children and the Dynamics of Infection in Families. *Pediatrics*. 2020;146(2).
105. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*. 2020;369:m1985.
106. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El Burai Felix S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(24):759-65.
107. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, et al. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics*. 2020;145(6).
108. Cui X, Zhao Z, Zhang T, Guo W, Guo W, Zheng J, et al. A systematic review and meta-analysis of children with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Med Virol*. 2021 Feb;93(2):1057-1069.
109. Gotzinger F, Santiago-Garcia B, Noguera-Julian A, Lanasa M, Lancella L, Calo Carducci FI, et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4(9):653-61.
110. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, Ferrari ME, Pusiol A, Nocerino A, et al. SARS-COV-2 infection in children and newborns: a systematic review. *Eur J Pediatr*. 2020;179(7):1029-46.
111. Ranabothu S, Onteddu S, Nalleballe K, Dandu V, Veerapaneni K, Veerapandiyani A. Spectrum of COVID-19 in children. *Acta Paediatr*. 2020;109(9):1899-900.

112. Ciuca IM. COVID-19 in Children: An Ample Review. *Risk Manag Healthc Policy*. 2020;13:661-9.
113. Del Barba P, Canarutto D, Sala E, Frontino G, Guarneri MP, Camesasca C, et al. COVID-19 cardiac involvement in a 38-day old infant. *Pediatr Pulmonol*. 2020;55(8):1879-81.
114. Stewart DJ, Hartley JC, Johnson M, Marks SD, du Pre P, Stojanovic J. Renal dysfunction in hospitalised children with COVID-19. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4(8):e28-e9.
115. Deep A, Bansal M, Ricci Z. Acute Kidney Injury and Special Considerations during Renal Replacement Therapy in Children with Coronavirus Disease-19: Perspective from the Critical Care Nephrology Section of the European Society of Paediatric and Neonatal Intensive Care. *Blood Purif*. 2020:1-11.
116. Nanda A, Vura NVRK, Gravenstein S. COVID-19 in older adults. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2020;32(7):1199-202.
117. Gomez-Belda AB, Fernandez-Garces M, Mateo-Sanchis E, Madrazo M, Carmona M, Piles-Roger L, et al. COVID-19 in older adults: What are the differences with younger patients? *Geriatr Gerontol Int*. 2020 Dec 2: 10.1111/ggi.14102.
118. McMichael TM, Currie DW, Clark S, Pogosjans S, Kay M, Schwartz NG, et al. Epidemiology of Covid-19 in a Long-Term Care Facility in King County, Washington. *N Engl J Med*. 2020;382(21):2005-11.
119. Leung C. Risk factors for predicting mortality in elderly patients with COVID-19: A review of clinical data in China. *Mech Ageing Dev*. 2020;188.
120. Mostaza JM, García-Iglesias F, González-Alegre T, Blanco F, Varas M, Hernández-Blanco C, et al. Clinical course and prognostic factors of COVID-19 infection in an elderly hospitalized population. *Arch Gerontol Geriatr*. 2020 November-December; 91: 104204.

121. Yan Q, Zuo P, Cheng L, Li Y, Song K, Chen Y, et al. Acute Kidney Injury Is Associated With In-hospital Mortality in Older Patients With COVID-19. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020 Jul 16: glaa181.
122. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics*. 2020;87(4):281-6.
123. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Place S, Van Laethem Y, Cabaraux P, Mat Q, et al. Clinical and epidemiological characteristics of 1420 European patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019. *J Intern Med*. 2020;288(3):335-44.
124. Zhang JJY, Lee KS, Ang LW, Leo YS, Young BE. Risk Factors for Severe Disease and Efficacy of Treatment in Patients Infected With COVID-19: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression Analysis. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2199-206.
125. Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, Chuich T, Laracy J, Biondi-Zoccai G, et al. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(18):2352-71.
126. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10239):1763-70.
127. Battle D, Soler MJ, Sparks MA, Hiremath S, South AM, Welling PA, et al. Acute Kidney Injury in COVID-19: Emerging Evidence of a Distinct Pathophysiology. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(7):1380-3.
128. Franca RA, Uggla L, Guadagno E, Russo D, Del Basso De Caro M. Neuroinvasive potential of SARS-CoV2 with neuroradiological and neuropathological findings: is the brain a target or a victim? *APMIS*. 2021;129(2):37-54.
129. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(6):1421-4.

130. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;18(4):844-7.
131. Pascarella G, Strumia A, Piliego C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med.* 2020;288(2):192-206.
132. Pray IW, Ford L, Cole D, Lee C, Bigouette JP, Abedi GR, et al. Performance of an Antigen-Based Test for Asymptomatic and Symptomatic SARS-CoV-2 Testing at Two University Campuses — Wisconsin, September–October 2020. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2021;69(5152):1642-7.
133. Alsuliman T, Sulaiman R, Ismail S, Srouf M, Alrstom A. COVID-19 paraclinical diagnostic tools: Updates and future trends. *Curr Res Transl Med.* 2020 Aug; 68(3): 83–91.
134. Fitzpatrick MC, Pandey A, Wells CR, Sah P, Galvani AP. Buyer beware: inflated claims of sensitivity for rapid COVID-19 tests. *The Lancet.* 2021;397(10268):24-5.
135. Padhi A, Kumar S, Gupta E, Saxena SK. Laboratory Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*2020. p. 95-107.
136. Zhai P, Ding Y, Wu X, Long J, Zhong Y, Li Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(5):105955.
137. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3).
138. Nie S-F, Yu M, Xie T, Yang F, Wang H-B, Wang Z-H, et al. Cardiac Troponin I is an Independent Predictor for Mortality in Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Circulation.* 2020 Aug 11;142(6):608-610.

139. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846-8.
140. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020;146(1):128-36.e4.
141. Chen LYC, Hoiland RL, Stukas S, Wellington CL, Sekhon MS. Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. *Eur Respir J.* 2020 Oct; 56(4): 2003006.
142. Wu M-y, Yao L, Wang Y, Zhu X-y, Wang X-f, Tang P-j, et al. Clinical evaluation of potential usefulness of serum lactate dehydrogenase (LDH) in 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *Respir Res.* 2020 Jul 6;21(1):171.
143. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology.* 2020;296(2):E32-E40.
144. Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. *N Engl J Med.* 2020;382(21):1969-73.
145. Gouglas D, Thanh Le T, Henderson K, Kaloudis A, Danielsen T, Hammersland NC, et al. Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *Lancet Glob Health.* 2018;6(12):e1386-e96.
146. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-33.
147. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(6):613-20.

148. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID-19-candidate-vaccines>. Dostęp 01.09.2021.
149. The New York Times. Coronavirus Vaccine Tracker 2020 <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html#jnj>. Dostęp 01.09.2021.
150. Forni G, Mantovani A. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ* . 2021 Feb;28(2):626-639.
151. Sir Karakus G, Tastan C, Dilek Kancagi D, Yurtsever B, Tumentemur G, Demir S, et al. Preclinical efficacy and safety analysis of gamma-irradiated inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Sci Rep* . 2021 Mar 11;11(1):5804.
152. Ella R, Vadrevu KM, Jogdand H, Prasad S, Reddy S, Sarangi V, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* . 2021 May;21(5):637-646.
153. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 2021 Feb;21(2):181-192.
154. Isakova-Sivak I, Rudenko L. A promising inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine. *Lancet Infect Dis* . 2021 Jan;21(1):2-3.
155. Wadman M. Will a small, long-shot U.S. company end up producing the best coronavirus vaccine? *Science*. 2020. doi: 10.1126/science.abf5474.
156. Luckow VA, Summers MD. Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors. *Nat Biotechnol*. 1988;6(1):47-55.

157. Gibbs WW. This Is How to Vaccinate the World: We can manufacture and distribute enough doses to protect humanity from COVID-19. *IEEE Spectrum*. 2021;58(1):32-7.
158. Souci L, Jaunet H, Le Diguether G, Guionnet J-M, Béven V, Paboeuf F, et al. Intranasal inoculations of naked or PLGA-PEI nanovectored DNA vaccine induce systemic and mucosal antibodies in pigs: A feasibility study. *Res Vet Sci*. 2020;132:194-201.
159. Gaudinski MR, Houser KV, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell RS, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet*. 2018;391(10120):552-62.
160. Diamond MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. *Annu Rev Med*. 2019;70:121-35.
161. Cheng MA, Farmer E, Huang C, Lin J, Hung CF, Wu TC. Therapeutic DNA Vaccines for Human Papillomavirus and Associated Diseases. *Hum Gene Ther*. 2018;29(9):971-96.
162. Xu Y, Yuen PW, Lam JK. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. *Pharmaceutics*. 2014;6(3):378-415.
163. Bachy M, Boudet F, Bureau M, Girerd-Chambaz Y, Wils P, Scherman D, et al. Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse. *Vaccine*. 2001;19(13-14):1688-93.
164. McGill University COVID19 Vaccine Tracker Team. COVID- 19 Vaccine Tracker 2021. <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/>. Dostęp 01.09.2021.
165. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 2020;586(7830):516-27.
166. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* . 2020 Jun;19:100682.

167. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambaut A, Lemey P, Baele G. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 2020 Aug 19;6(2):veaa061.
168. Rambaut A, Nick Loman N, Oliver Pybus O, et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. *Virological.org*. 2020. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563/5>. Dostęp 01.09.2021.
169. Walensky RP, Walke HT, Fauci AS. SARS-CoV-2 Variants of Concern in the United States—Challenges and Opportunities. *JAMA*. 2021 Mar 16;325(11):1037-1038.
170. Wise J. Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. *BMJ*. 2020 Dec 16;371:m4857.
171. Chan KK, Tan TJC, Narayanan KK, Procko E. An engineered decoy receptor for SARS-CoV-2 broadly binds protein S sequence variants. *Sci Adv*. 2021 Feb;7(8):eabf1738.
172. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*. 2020;182(5):1295-310.e20.
173. Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, Eymieux S, et al. Screening of the H69 and V70 deletions in the SARS-CoV-2 spike protein with a RT-PCR diagnosis assay reveals low prevalence in Lyon, France. *Eurosurveillance*. 2021 Jan 21;26(3).
174. Gu H, Chen Q, Yang G, He L, Fan H, Deng Y-Q, et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*. 2020 Jul 30;369(6511):1603–7.
175. World Health Organization.. SARS-CoV-2 Variant – United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland 2020. <https://www.who.int/csr/don/21-december-2020-sars-cov2-variant-united-kingdom/en/>. Dostęp 01.09.2021.

176. Davies NG, Jarvis CI, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K, Keogh RH. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature* 593, 270–274 (2021).
177. Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine induced sera. *Cell* . 2021 Apr 29;184(9):2348-2361.e6.
178. Zucman N, Uhel F, Descamps D, Roux D, Ricard J-D. Severe reinfection with South African SARS-CoV-2 variant 501Y.V2: A case report. *Clin Infect Dis* . 2021 Feb 10;ciab129.
179. Nonaka CKV, Franco MM, Graf T, de Lorenzo Barcia CA, de Avila Mendonca RN, de Sousa KAF, et al. Genomic Evidence of SARS-CoV-2 Reinfection Involving E484K Spike Mutation, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(5).
180. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N Engl J Med*. 2021;385(7):585-94.
181. Bromley SM. Smell and taste disorders: a primary care approach. *Am Fam Physician*. 2000;61(2):427-36, 38.
182. Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease – A multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15(7):490-4.
183. Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC, et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology*. 2011;25(1):1-14.
184. Velayudhan L. Smell identification function and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Psychiatry*. 2015;28(2):173-9.
185. Pryse-Phillips W. Disturbance in the sense of smell in psychiatric patients. *Proc R Soc Med*. 1975;68(8):472-4.

186. Naka A, Riedl M, Luger A, Hummel T, Mueller CA. Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267(4):547-50.
187. Bergasa N. Hypothesis: taste disorders in patients with liver disease may be mediated in the brain: potential mechanisms for a central phenomenon. *The American Journal of Gastroenterology.* 1998;93(8):1209-10.
188. Imam SA, Lao WP, Reddy P, Nguyen SA, Schlosser RJ. Is SARS-CoV-2 (COVID-19) postviral olfactory dysfunction (PVOD) different from other PVOD? *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery.* 2020;6:S26-S32.
189. Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):539-42.
190. Tian J, Pinto JM, Li L, Zhang S, Sun Z, Wei Y. Identification of Viruses in Patients With Postviral Olfactory Dysfunction by Multiplex Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Laryngoscope.* 2021 Jan;131(1):158-164.
191. Seiden AM. Postviral olfactory loss. *Otolaryngol Clin North Am.* 2004;37(6):1159-66.
192. Seiden A. *Taste and Smell Disorders: Rhinology and Sinusology.* New York: Thieme; 1997. p. 4–19.
193. Åkerlund A, Bende M, Murphy C. Olfactory Threshold and Nasal Mucosal Changes in Experimentally Induced Common Cold. *Acta Otolaryngol.* 2009;115(1):88-92.
194. Mori I, Goshima F, Imai Y, Kohsaka S, Sugiyama T, Yoshida T, et al. Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol.* 2002;83(9):2109-16.
195. Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. *Rev Med Virol.* 2004;14(4):209-16.

196. Konstantinidis I, Haehner A, Frasnelli J, Reden J, Quante G, Damm M, et al. Post-infectious olfactory dysfunction exhibits a seasonal pattern. *Rhinology*. 2006;44(2):135-9.
197. Menni C, Sudre CH, Steves CJ, Ourselin S, Spector TD. Quantifying additional COVID-19 symptoms will save lives. *The Lancet*. 2020;395(10241):e107-e8.
198. Klopfenstein T, Zahra H, Kadiane-Oussou NJ, Lepiller Q, Royer PY, Toko L, et al. New loss of smell and taste: Uncommon symptoms in COVID-19 patients on Nord Franche-Comte cluster, France. *Int J Infect Dis*. 2020 Nov; 100: 117–122.
199. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Beckers E, Mustin V, Ducarme M, Journe F, et al. Prevalence and 6-month recovery of olfactory dysfunction: a multicentre study of 1363 COVID-19 patients. *J Intern Med*. 2021;290(2):451-61.
200. Vaira LA, Hopkins C, Petrocelli M, Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Salzano G, et al. Smell and taste recovery in coronavirus disease 2019 patients: a 60-day objective and prospective study. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2020;134(8):703-9.
201. Chiesa-Estomba CM, Lechien JR, Radulesco T, Michel J, Sowerby LJ, Hopkins C, et al. Patterns of smell recovery in 751 patients affected by the COVID-19 outbreak. *Eur J Neurol*. 2020;27(11):2318-21.
202. Reiter ER, Coelho DH, Kons ZA, Costanzo RM. Subjective smell and taste changes during the COVID-19 pandemic: Short term recovery. *Am J Otolaryngol*. Nov-Dec 2020;41(6):102639.
203. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Soler MJ. Circulating ACE2 in Cardiovascular and Kidney Diseases. *Curr Med Chem* . 2017;24(30):3231-3241.
204. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen 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):271-80.e8.

205. Zhao M-M, Yang W-L, Yang F-Y, Zhang L, Huang W, Hou W, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct Target Ther* . 2021 Mar 27;6(1):134.
206. Davenport MP, Padmanabhan P, Desikan R, Dixit NM. Targeting TMPRSS2 and Cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection. *PLoS Comput Biol* . 2020 Dec 8;16(12):e1008461.
207. Soares CD, Mosqueda-Taylor A, Hernandez-Guerrero JC, Carvalho MGF, Almeida OP. Immunohistochemical expression of angiotensin-converting enzyme 2 in minor salivary glands during SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol* . 2021 Apr;93(4):1905-1906.
208. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, et al. Epithelial Cells Lining Salivary Gland Ducts Are Early Target Cells of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the Upper Respiratory Tracts of Rhesus Macaques. *J Virol*. 2011;85(8):4025-30.
209. Wang WK, Chen SY, Liu IJ, Chen YC, Chen HL, Yang CF, et al. Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1213-9.
210. Laurendon T, Radulesco T, Mugnier J, G erault M, Chagnaud C, El Ahmadi A-A, et al. Bilateral transient olfactory bulb edema during COVID-19-related anosmia. *Neurology*. 2020;95(5):224-5.
211. Politi LS, Salsano E, Grimaldi M. Magnetic Resonance Imaging Alteration of the Brain in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Anosmia. *JAMA Neurology*. 2020;77(8).
212. Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C, Lipovsek M, Van den Berge K, Gong B, et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv* . 2020 Jul 31;6(31):eabc5801.

213. Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, Tallant EA. Distinct roles for ANG II and ANG-(1–7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(2):C420-C6.
214. Doobay MF, Talman LS, Obr TD, Tian X, Davisson RL, Lazartigues E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007;292(1):R373-R81.
215. Xiong C, Feng Y, Chen M, Li X, Chen L. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 2020;116(6):1097-100.
216. He L, Mäe MA, Muhl L, Sun Y, Pietilä R, Nahar K, et al. Pericyte-specific vascular expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 – implications for microvascular inflammation and hypercoagulopathy in COVID-19 patients. *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.05.11.088500
217. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5).
218. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33238-43.
219. Chen R, Wang K, Yu J, Howard D, French L, Chen Z, et al. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. *Front Neurol*. 2021 Jan 20;11:573095.
220. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev Cell*. 2011;21(2):193-215.
221. Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis*. 2020;94:55-8.

222. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host–Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(7):995-8.
223. Li YC, Bai WZ, Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2020;92(6):552-5.
224. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, Mothes R, Franz J, Laue M, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci*. 2021 Feb;24(2):168-175.
225. Morris M, Zohrabian VM. Neuroradiologists, Be Mindful of the Neuroinvasive Potential of COVID-19. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2020;41(6):E37-E9.
226. Michalicová A, Bhide K, Bhide M, Kováč A. How viruses infiltrate the central nervous system. *Acta Virol*. 2017;61(04):393-400.
227. Wright EJ, Brew BJ, Wesselingh SL. Pathogenesis and Diagnosis of Viral Infections of the Nervous System. *Neurol Clin*. 2008;26(3):617-33.
228. Al-Obaidi MMJ, Bahadoran A, Wang SM, Manikam R, Raju CHS, Sekaran SD. Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system. *Acta Virol*. 2018;62(01):16-27.
229. Soung A, Klein RS. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol Med*. 2018;24(11):950-62.
230. Mohammed AK, Magnusson O, Maehlen J, Fonnum F, Norrby E, Schultzberg M, et al. Behavioural deficits and serotonin depletion in adult rats after transient infant nasal viral infection. *Neuroscience*. 1990;35(2):355-63.
231. Perlman S, Evans G, Afifi A. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J Exp Med*. 1990;172(4):1127-32.

232. Vaira LA, Salzano G, Fois AG, Piombino P, De Riu G. Potential pathogenesis of ageusia and anosmia in COVID-19 patients. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(9):1103-4.
233. Lozada-Nur F, Chainani-Wu N, Fortuna G, Sroussi H. Dysgeusia in COVID-19: Possible Mechanisms and Implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;130(3):344-6.
234. Matsuo R. Role of Saliva in the Maintenance of Taste Sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2016;11(2):216-29.
235. Henkin RI, Bradley DF. Hypogeusia corrected by Ni⁺⁺ and Zn⁺⁺. *Life Sci*. 1970;9(12):701-9.
236. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci*. 1999;318(6):380-91.
237. Pellegrino R, Cooper KW, Di Pizio A, Joseph PV, Bhutani S, Parma V. Corona Viruses and the Chemical Senses: Past, Present, and Future. *Chem Senses*. 2020 May 14: bjaa031.
238. Mehraeen E, Behnezhad F, Salehi MA, Noori T, Harandi H, SeyedAlinaghi S. Olfactory and gustatory dysfunctions due to the coronavirus disease (COVID-19): a review of current evidence. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Feb;278(2):307-312.
239. Mercante G, Ferreli F, De Virgilio A, Gaino F, Di Bari M, Colombo G, et al. Prevalence of Taste and Smell Dysfunction in Coronavirus Disease 2019. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* . 2020 Aug 1;146(8):723-728.
240. Kirking HL, Tate JE, Nabity SA, Ye D, Pray IW, Westergaard RP, et al. Loss of Taste and Smell as Distinguishing Symptoms of Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020.
241. Carrillo-Larco RM, Altez-Fernandez C. Anosmia and dysgeusia in COVID-19: A systematic review. *Wellcome Open Res*. 2020; 5: 94.

242. Sayin İ, Yaşar KK, Yazici ZM. Taste and Smell Impairment in COVID-19: An AAO-HNS Anosmia Reporting Tool-Based Comparative Study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020 Sep;163(3):473-479.
243. Kang YJ, Cho JH, Lee MH, Kim YJ, Park C-S. The diagnostic value of detecting sudden smell loss among asymptomatic COVID-19 patients in early stage: The possible early sign of COVID-19. *Auris Nasus Larynx.* 2020 Aug; 47(4): 565–573.
244. Zayet S, Klopfenstein T, Mercier J, Kadiane-Oussou NJ, Lan Cheong Wah L, Royer PY, et al. Contribution of anosmia and dysgeusia for diagnostic of COVID-19 in outpatients. *Infection.* 2021 Apr;49(2):361-365.
245. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol.* 2020;92(7):903-8.
246. Wang TZ, Sell J, Weiss D, Lall R. COVID-19 presenting as anosmia and dysgeusia in New York City emergency departments, March - April, 2020. *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.07.06.20147751.
247. Vaira LA, Deiana G, Fois AG, Pirina P, Madeddu G, De Vito A, et al. Objective evaluation of anosmia and ageusia in COVID-19 patients: Single-center experience on 72 cases. *Head Neck.* 2020;42(6):1252-8.
248. Gerkin RC, Ohla K, Veldhuizen MG, Joseph PV, Kelly CE, Bakke AJ, et al. Recent Smell Loss Is the Best Predictor of COVID-19 Among Individuals With Recent Respiratory Symptoms. *Chem Senses.* 2021 Jan 1;46:bjaa081.
249. Menni C, Valdes AM, Freidin MB, Sudre CH, Nguyen LH, Drew DA, et al. Real-time tracking of self-reported symptoms to predict potential COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1037-40.
250. Mizrahi B, Shilo S, Rossman H, Kalkstein N, Marcus K, Barer Y, et al. Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection. *Nat Commun.* 2020 Dec 4;11(1):6208.

251. Koyama AK, Siegel DA, Oyegun E, Hampton W, Maddox N, Koumans EH. Symptoms Reported With New Onset of Loss of Taste or Smell in Individuals With and Without SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2021.
252. Huart C, Philpott C, Konstantinidis I, Altundag A, Whitcroft KL, Trecca EMC, et al. Comparison of COVID-19 and common cold chemosensory dysfunction. *Rhinology*. 2020 Dec 1;58(6):623-625.
253. Biadsee A, Biadsee A, Kassem F, Dagan O, Masarwa S, Ormianer Z. Olfactory and Oral Manifestations of COVID-19: Sex-Related Symptoms-A Potential Pathway to Early Diagnosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;163(4):722-8.
254. Parma V, Ohla K, Veldhuizen MG, Niv MY, Kelly CE, Bakke AJ, et al. More than smell - COVID-19 is associated with severe impairment of smell, taste, and chemesthesis. *Chemical Senses*. 2020 Jun 20;45(7):609–22.
255. Salmon Ceron D, Bartier S, Hautefort C, Nguyen Y, Nevoux J, Hamel A-L, et al. Self-reported loss of smell without nasal obstruction to identify COVID-19. The multicenter Coronosmia cohort study. *Journal of Infection*. 2020;81(4):614-20.
256. Diego VJSDUH-US. Loss of smell and taste validated as COVID-19 symptoms. health.ucsd.edu/news/releases/Pages/2020-04-13-loss-of-smell-and-taste-validated-as-covid19-symptoms-in-patients-with-high-recovery-rate.aspx. Dostęp 01.09.2021.
257. Center for Disease Control and Prevention. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) – Symptoms 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Dostęp 01.09.2021.
258. NHS. Lost or changed sense of smell. <https://www.nhs.uk/conditions/lost-or-changed-sense-smell>. Dostęp 01.09.2021.
259. Practices BB. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) - Symptoms, diagnosis and treatment. <https://www.bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000168>. Dostęp 01.09.2021.

260. Menni C, Sudre CH, Steves CJ, Ourselin S, Spector TD. Quantifying additional COVID-19 symptoms will save lives. *Lancet*. 2020;395(10241):e107-e8.
261. Spadera L, Viola P, Pisani D, Scarpa A, Malanga D, Sorrentino G, et al. Sudden olfactory loss as an early marker of COVID-19: a nationwide Italian survey. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020 Aug 4: 1–9.
262. Kaye R, Chang CWD, Kazahaya K, Brereton J, Denny JC. COVID-19 Anosmia Reporting Tool: Initial Findings. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2020;163(1):132-4.
263. Klein H, Asseo K, Karni N, Benjamini Y, Nir-Paz R, Muszkat M, et al. Onset, duration, and persistence of taste and smell changes and other COVID-19 symptoms: longitudinal study in Israeli patients. *Clin Microbiol Infect* . 2021 Feb 16;27(5):769-774.
264. Sakalli E, Temirbekov D, Bayri E, Alis EE, Erdurak SC, Bayraktaroglu M. Ear nose throat-related symptoms with a focus on loss of smell and/or taste in COVID-19 patients. *Am J Otolaryngol*. 2020;41(6).
265. Meini S, Suardi LR, Busoni M, Roberts AT, Fortini A. Olfactory and gustatory dysfunctions in 100 patients hospitalized for COVID-19: sex differences and recovery time in real-life. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(12):3519-23.
266. Huart C, Philpott C, Konstantinidis I, Altundag A, Whitcroft KL, Trecca EMC, et al. Comparison of COVID-19 and common cold chemosensory dysfunction. *Rhinology*. 2020;58(6):623-5.
267. Landis BN, Welge-Luessen A, Brämerson A, Bende M, Mueller CA, Nordin S, et al. “Taste Strips” – A rapid, lateralized, gustatory bedside identification test based on impregnated filter papers. *J Neurol*. 2009;256(2):242-8.
268. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63(6):1256-72.

269. Carvelli J, Demaria O, Vély F, Batista L, Chouaki Benmansour N, Fares J, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a–C5aR1 axis. *Nature*. 2020;588(7836):146-50.
270. Roper SD, Chaudhari N. Taste buds: cells, signals and synapses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18(8):485-97.
271. Bachmanov A, Bosak N, Lin C, Matsumoto I, Ohmoto M, Reed D, et al. Genetics of Taste Receptors. *Curr Pharm Des*. 2014;20(16):2669-83.
272. DuBois GE. Molecular mechanism of sweetness sensation. *Physiol Behav*. 2016;164(Pt B):453-63.
273. Hartley IE, Liem DG, Keast R. Umami as an 'Alimentary' Taste. A New Perspective on Taste Classification. *Nutrients*. 2019;11(1).
274. Behrens M, Meyerhof W. Vertebrate Bitter Taste Receptors: Keys for Survival in Changing Environments. *J Agric Food Chem*. 2018;66(10):2204-13.
275. Bigiani A. Does ENaC Work as Sodium Taste Receptor in Humans? *Nutrients* . 2020 Apr 24;12(4):1195.
276. Tu YH, Cooper AJ, Teng B, Chang RB, Artiga DJ, Turner HN, et al. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science*. 2018;359(6379):1047-50.
277. Leffler A, Monter B, Koltzenburg M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience*. 2006;139(2):699-709.
278. Barham HP, Taha MA, Hall CA. Does phenotypic expression of bitter taste receptor T2R38 show association with COVID-19 severity? *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(11):1255-7.

279. Ortega FJ, Aguera Z, Sabater M, Moreno-Navarrete JM, Alonso-Ledesma I, Xifra G, et al. Genetic variations of the bitter taste receptor TAS2R38 are associated with obesity and impact on single immune traits. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(7):1673-83.
280. Inoue H, Yamakawa-Kobayashi K, Suzuki Y, Nakano T, Hayashi H, Kuwano T. A case study on the association of variation of bitter-taste receptor gene TAS2R38 with the height, weight and energy intake in Japanese female college students. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59(1):16-21.
281. Keller KL, Reid A, MacDougall MC, Cassano H, Song JL, Deng L, et al. Sex differences in the effects of inherited bitter thiourea sensitivity on body weight in 4-6-year-old children. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(6):1194-200.
282. Castaldo A, Cernera G, Iacotucci P, Cimbalo C, Gelzo M, Comegna M, et al. TAS2R38 is a novel modifier gene in patients with cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):5806.
283. Lee RJ, Kofonow JM, Rosen PL, Siebert AP, Chen B, Doghramji L, et al. Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1393-405.
284. Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*. 2009;325(5944):1131-4.
285. Carey RM, Adappa ND, Palmer JN, Lee RJ, Cohen NA. Taste Receptors: Regulators of Sinonasal Innate Immunity. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2016;1(4):88-95.
286. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, et al. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*. 2010;35(2):157-70.
287. Zhang Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(1):127-35.

288. Sugantha Priya E, Selvakumar K, Bavithra S, Elumalai P, Arunkumar R, Raja Singh P, et al. Anti-cancer activity of quercetin in neuroblastoma: an in vitro approach. *Neurol Sci.* 2014;35(2):163-70.
289. Krishnakumar N, Sulfikkarali N, RajendraPrasad N, Karthikeyan S. Enhanced anticancer activity of naringenin-loaded nanoparticles in human cervical (HeLa) cancer cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition.* 2011;1(4):223-31.
290. Singh N, Chakraborty R, Bhullar RP, Chelikani P. Differential expression of bitter taste receptors in non-cancerous breast epithelial and breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(2):499-503.
291. Bufe B, Breslin PAS, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, et al. The Molecular Basis of Individual Differences in Phenylthiocarbamide and Propylthiouracil Bitterness Perception. *Curr Biol.* 2005;15(4):322-7.
292. Fox AL. The Relationship between Chemical Constitution and Taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1932;18(1):115-20.
293. Kalmus H. Improvements in the Classification of the Taster Genotypes. *Ann Hum Genet.* 1958;22(3):222-30.
294. Smith JL, Estus S, Lennie TA, Moser DK, Chung ML, Mudd-Martin G. TAS2R38 PAV Haplotype Predicts Vegetable Consumption in Community-Dwelling Caucasian Adults at Risk for Cardiovascular Disease. *Biol Res Nurs.* 2020;22(3):326-33.
295. Maina IW, Workman AD, Cohen NA. The role of bitter and sweet taste receptors in upper airway innate immunity: Recent advances and future directions. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2018;4(3):200-8.
296. Li X, Zhang C, Liu L, Gu M. Existing bitter medicines for fighting 2019-nCoV-associated infectious diseases. *The FASEB Journal.* 2020;34(5):6008-16.

297. Konstantinidis I, Delides A, Tsakiropoulou E, Maragoudakis P, Sapounas S, Tsiodras S. Short-Term Follow-Up of Self-Isolated COVID-19 Patients with Smell and Taste Dysfunction in Greece: Two Phenotypes of Recovery. *Orl*. 2020;82(6):295-303.
298. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Ostrander BT, DeConde AS. Self-reported olfactory loss associates with outpatient clinical course in COVID-19. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(7):821-31.
299. Lampuré A, Schlich P, Deglaire A, Castetbon K, Péneau S, Hercberg S, et al. Sociodemographic, Psychological, and Lifestyle Characteristics Are Associated with a Liking for Salty and Sweet Tastes in French Adults. *The Journal of Nutrition*. 2015;145(3):587-94.
300. Beets MW, Weaver RG, Tilley F, Turner-McGrievy G, Huberty J, Ward DS, et al. Salty or Sweet? Nutritional Quality, Consumption, and Cost of Snacks Served in Afterschool Programs. *J Sch Health*. 2015;85(2):118-24.
301. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Boone CE, DeConde AS. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(7):806-13.
302. Bigiani A. Gustatory dysfunctions in COVID-19 patients: possible involvement of taste renin-angiotensin system (RAS). *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2395.
303. Rydzewski B, Pruszevicz A, Sulkowski WJ. Assessment of smell and taste in patients with allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol*. 2000;120(2):323-6.
304. Bozkurt G, Elhassan HA, Sozen E, Soytaş P, Erol ZN, Guvenc MG, et al. Assessment of taste functions in allergic rhinitis patients undergoing allergen-specific immunotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276(2):439-45.
305. Mair M, Singhavi H, Pai A, Singhavi J, Gandhi P, Conboy P, et al. A Meta-Analysis of 67 Studies with Presenting Symptoms and Laboratory Tests of COVID-19 Patients. *Laryngoscope* . 2021 Jun;131(6):1254-1265.

306. Henkin RI, Levy LM, Fordyce A. Taste and smell function in chronic disease. *Am J Otolaryngol*. 2013;34(5):477-89.
307. Welge-Lussen A, Wolfensberger M. Olfactory disorders following upper respiratory tract infections. *Adv Otorhinolaryngol*. 2006;63:125-32.
308. Beltrán-Corbellini Á, Chico-García JL, Martínez-Poles J, Rodríguez-Jorge F, Natera-Villalba E, Gómez-Corral J, et al. Acute-onset smell and taste disorders in the context of COVID-19: a pilot multicentre polymerase chain reaction based case-control study. *Eur J Neurol*. 2020;27(9):1738-41.
309. Maechler F, Gertler M, Hermes J, van Loon W, Schwab F, Piening B, et al. Epidemiological and clinical characteristics of SARS-CoV-2 infections at a testing site in Berlin, Germany, March and April 2020-a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(12):1685 e7- e12.
310. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Boone CE, DeConde AS. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(7):806-13.
311. Rojas-Lechuga MJ, Izquierdo-Dominguez A, Chiesa-Estomba C, Calvo-Henriquez C, Villarreal IM, Cuesta-Chasco G, et al. Chemosensory dysfunction in COVID-19 out-patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* . 2021 Mar;278(3):695-702.
312. Liu G, Zong G, Doty RL, Sun Q. Prevalence and risk factors of taste and smell impairment in a nationwide representative sample of the US population: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2016;6(11):e013246.
313. Hintschich CA, Wenzel JJ, Hummel T, Hankir MK, Kühnel T, Vielsmeier V, et al. Psychophysical tests reveal impaired olfaction but preserved gustation in COVID-19 patients. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(9):1105-7.

314. Vaira LA, Lechien JR, Salzano G, Salzano FA, Maglitter F, Saussez S, et al. Gustatory Dysfunction: A Highly Specific and Smell-Independent Symptom of COVID-19. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;1-3.
315. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2020;277(8):2251-61.
316. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020;77(6):683-90.
317. Lee Y, Min P, Lee S, Kim SW. Prevalence and Duration of Acute Loss of Smell or Taste in COVID-19 Patients. *J Korean Med Sci.* 2020;35(18):e174.
318. Henkin RI, Larson AL, Powell RD. Hypogeusia, Dysgeusia, Hyposmia, and Dysosmia following Influenza-Like Infection. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2016;84(5):672-82.
319. Saniasiaya J, Islam MA, Abdullah B. Prevalence of Olfactory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-analysis of 27,492 Patients. *The Laryngoscope.* 2020;131(4):865-78.
320. Lechien JR, Diallo AO, Dachy B, Le Bon SD, Maniaci A, Vaira LA, et al. COVID-19: Post-vaccine Smell and Taste Disorders: Report of 6 Cases. *Ear Nose Throat J.* 2021 Sep 1;1455613211033125.
321. Fiser D, Borotski L. [Anosmia after administration of influenza vaccine]. *Med Pregl.* 1979;32(9-10):455-7.
322. Doty RL, Berman AH, Izhar M, Hamilton HB, Villano D, Vazquez BE, et al. Influenza Vaccinations and Chemosensory Function. *American Journal of Rhinology & Allergy.* 2014;28(1):50-3.

323. Bénézit F, Le Turnier P, Declerck C, Paillé C, Revest M, Dubée V, et al. Utility of hyposmia and hypogeusia for the diagnosis of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep; 20(9): 1014–1015.
324. Wee LE, Chan YFZ, Teo NWY, Cherng BPZ, Thien SY, Wong HM, et al. The role of self-reported olfactory and gustatory dysfunction as a screening criterion for suspected COVID-19. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2389-90.
325. Safari S, Baratloo A, Elfil M, Negida A. Evidence Based Emergency Medicine; Part 5 Receiver Operating Curve and Area under the Curve. *Emerg (Tehran)*. 2016;4(2):111-3.
326. Gostic KM, Kucharski AJ, Lloyd-Smith JO. Effectiveness of traveller screening for emerging pathogens is shaped by epidemiology and natural history of infection. *eLife*. 2015;4.
327. Bitar D, Goubar A, Desenclos JC. International travels and fever screening during epidemics: a literature review on the effectiveness and potential use of non-contact infrared thermometers. *Euro Surveill*. 2009;14(6).
328. Priest PC, Duncan AR, Jennings LC, Baker MG. Thermal image scanning for influenza border screening: results of an airport screening study. *PLoS One*. 2011;6(1):e14490.
329. Tay MR, Low YL, Zhao X, Cook AR, Lee VJ. Comparison of Infrared Thermal Detection Systems for mass fever screening in a tropical healthcare setting. *Public Health*. 2015;129(11):1471-8.
330. Gerkin RC, Ohla K, Veldhuizen MG, Joseph PV, Kelly CE, Bakke AJ, et al. Recent smell loss is the best predictor of COVID-19 among individuals with recent respiratory symptoms. *Chem Senses* . 2021 Jan 1;46:bjaa081.
331. Calvo-Henriquez C, Maldonado-Alvarado B, Chiesa-Estomba C, Rivero-Fernandez I, Sanz-Rodriguez M, Villarreal IM, et al. Ethyl alcohol threshold test: a fast, reliable and affordable olfactory Assessment tool for COVID-19 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(10):2783-92.

332. Zimmerman RK, Nowalk MP, Bear T, Taber R, Clarke KS, Sax TM, et al. Proposed clinical indicators for efficient screening and testing for COVID-19 infection using Classification and Regression Trees (CART) analysis. *Hum Vaccin Immunother* . 2021 Apr 3;17(4):1109-1112.
333. Bidkar V, Mishra M, Selvaraj K, Joshi P, H SB, Dabhekar S, et al. Testing Olfactory and Gustatory Dysfunctions among Quarantine COVID-19 Suspects. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020:1-6.
334. Roland LT, Gurrola JG, 2nd, Loftus PA, Cheung SW, Chang JL. Smell and taste symptom-based predictive model for COVID-19 diagnosis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(7):832-8.
335. Haehner A, Draf J, Drager S, de With K, Hummel T. Predictive Value of Sudden Olfactory Loss in the Diagnosis of COVID-19. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2020;82(4):175-80.
336. Vaira LA, Salzano G, Petrocelli M, Deiana G, Salzano FA, De Riu G. Validation of a self-administered olfactory and gustatory test for the remotely evaluation of COVID-19 patients in home quarantine. *Head Neck*. 2020;42(7):1570-6.
337. Nin T, Sakagami M, Sone-Okunaka M, Muto T, Mishiro Y, Fukazawa K. Taste function after section of chorda tympani nerve in middle ear surgery. *Auris Nasus Larynx*. 2006;33(1):13-7.
338. Tomofuji S, Sakagami M, Kushida K, Terada T, Mori H, Kakibuchi M. Taste disturbance after tonsillectomy and laryngomicrosurgery. *Auris Nasus Larynx*. 2005;32(4):381-6.
339. Morton RP, Hay KD, Goldsmith DB, Stillman JA. Patterns of sensory recovery in the lingual nerve after surgical trauma. *N Z Dent J*. 2005;101(2):53-7.
340. Ikui A. A review of objective measures of gustatory function. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2002(546):60-8.

341. Ellegård EK, Hay KD, Morton RP. Is electrogustometry useful for screening abnormalities of taste? *The Journal of Laryngology & Otology*. 2007;121(12):1161-4.
342. Stillman JA, Morton RP, Hay KD, Ahmad Z, Goldsmith D. Electrogustometry: strengths, weaknesses, and clinical evidence of stimulus boundaries. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2003;28(5):406-10.
343. Kang MG, Choi JH, Kho HS. Relationships between gustatory function tests. *Oral Dis*. 2020;26(4):830-7.
344. Lechien JR, Hsieh JW, Ayad T, Fakhry N, Hans S, Chiesa-Estomba CM, et al. Gustatory dysfunctions in COVID-19. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2397-8.
345. Klopfenstein T, Kadiane-Oussou NJ, Toko L, Royer PY, Lepiller Q, Gendrin V, et al. Features of anosmia in COVID-19. *Med Mal Infect*. 2020;50(5):436-9.
346. Fjaeldstad AW. Prolonged complaints of chemosensory loss after COVID-19. *Dan Med J*. 2020;67(8).