

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA

ALMIR RIBEIRO DA SILVA JUNIOR

Detecção de anticorpos IgG e anticorpos totais neutralizantes para  
variantes de preocupação de SARS-CoV-2 em indivíduos saudáveis após  
vacinação para COVID-19

São Paulo  
2024

ALMIR RIBEIRO DA SILVA JUNIOR

Detecção de anticorpos IgG e anticorpos totais neutralizantes para variantes de preocupação de SARS-CoV-2 em indivíduos saudáveis após vacinação para COVID-19

**Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Maria Cassia Jacintho Mendes Corrêa

São Paulo

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Junior, Almir Ribeiro da

Detecção de anticorpos IgG e anticorpos totais neutralizantes para variantes de preocupação de SARS-CoV-2 em indivíduos saudáveis após vacinação para COVID-19 / Almir Ribeiro da Silva Junior; Maria Cassia Jacintho Mendes Corrêa, orientadora. -- São Paulo, 2024.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. SARS-CoV-2 2. COVID-19 3. Teste sorológico para COVID-19 4. Testes de neutralização 5. Vacinas contra COVID-19  
I. Corrêa, Maria Cassia Jacintho Mendes, orient. II. Título

USP/FM/DBD-048/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Maria Cássia Mendes Correa, por toda a orientação profissional, apoio e suporte primordiais, todos os comentários construtivos e o compromisso com a excelência acadêmica, pontos que foram essenciais para o sucesso deste trabalho e fundamentais para minha jornada acadêmica.

À Dra. Tânia Regina Tozetto-Mendoza, por todos os ensinamentos teóricos e práticos imprescindíveis, e pela supervisão nas minhas atividades durante o período de Mestrado, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

À MsC. Lucy Santos Vilas Boas por todo o conhecimento, ensinamentos, orientação e supervisão nas atividades práticas a mim passados, por todas as oportunidades no Laboratório e todas lições de vida desde o início do programa de pós-graduação, que foram sem dúvidas muito importantes para mim.

Aos voluntários que participaram deste estudo, aqui deixo a minha gratidão. Sem o comprometimento de cada um de vocês, este estudo não teria sido possível.

À toda equipe e funcionários do Laboratório de Virologia pelo extenso aprendizado, companheirismo, amizade e conhecimento imensuráveis adquiridos.

Aos alunos com os quais convivi durante o Mestrado: Layla, Heuder, Giovanna, Rodrigo, Caio, Amanda, Bruno Guedes, Giovana, Erick, Bruno Miyagui e Natan, que compartilharam ideias, desafios, conselhos e sucessos, tornando esta jornada acadêmica ainda mais enriquecedora.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor incondicional, por todo o suporte desde a minha infância e no apoio ao meu crescimento pessoal e profissional. A todos os meus amigos que mesmo distantes fisicamente estiveram presentes em ótimas conversas e conselhos.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Instituto de Medicina Tropical pela oportunidade em realizar e desenvolver este projeto, e pela estadia durante estes anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro durante o projeto.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original”

**Albert Einstein**

## RESUMO

Silva Jr. AR. Detecção de anticorpos IgG e anticorpos totais neutralizantes para variantes de preocupação de SARS-CoV-2 em indivíduos saudáveis após vacinação para COVID-19 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

**INTRODUÇÃO:** A pandemia da COVID-19 demandou de forma imediata o desenvolvimento, aplicação e avaliação dos métodos laboratoriais clássicos de sorologia por serem tecnicamente acessíveis em tempo real e por atenderem naquele momento às necessidades emergentes de diagnóstico do SARS-CoV-2 e traçar o perfil epidemiológico da exposição a esse novo coronavírus. Os métodos sorológicos nos permitiram compreender a dinâmica e extensão dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 diante do surgimento das variantes virais de preocupação (VOCs) e que vieram a impactar na elaboração das vacinas. **OBJETIVOS:** Diante desses fatos o presente estudo se propôs a : (1) Avaliar a acurácia e desempenho dos testes ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 por meio de soros controles; (2) Avaliar a dinâmica de produção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 e anticorpos neutralizantes no soro de indivíduos durante o esquema vacinal de introdução da vacina Coronavac e reforço por vacina Pfizer em São Paulo no período de um ano; (3) Investigar a correlação entre anticorpos IgG anti-S1 e rN+rDB e anticorpos neutralizantes detectados pelo teste de neutralização viral convencional (cVNT) e teste de neutralização sintético (sVNT). **MÉTODOS:** Uma coorte de 41 profissionais de saúde da Faculdade de Medicina da USP foi acompanhada ao longo de um ano (março de 2021 a março de 2022) durante o esquema vacinal contra a COVID-19, com intervalos de 32 e 186 dias após a segunda dose da CoronaVac® e após 62 e 150 dias da imunização de reforço (Pfizer®). A dinâmica da produção de anticorpos IgG foi avaliada por dois testes ELISA, um para anti-S1 e outro para anti-rN+rDB, cujo desempenho foi primeiramente avaliado com 254 soros controles. Além disso, a produção de anticorpos neutralizantes contra as VOCs Gama, Delta e Ômicron foi medida por meio do teste de neutralização viral convencional (cVNT), baseado em cultura celular, e do teste imunoenzimático de VNT sintético (sVNT), baseado na inibição da ligação ACE2 e antígeno S1. **RESULTADOS:** Os testes ELISA IgG anti-S1 e anti-rN+rDB demonstraram alta acurácia, com área sob a curva ROC superior

a 0,9. A sensibilidade do teste ELISA para anticorpos IgG anti-rN+RDB foi de 96,3%, para anti-S1 foi de 94,0%. As especificidades foram de 96,6% e de 98,3%, respectivamente. A combinação dos resultados de ambos os testes aumentou a sensibilidade para 98,0% e a especificidade para 100%. Na população vacinada, a frequência de soropositivos aumentou após 32 dias, reduzindo-se significativamente após o sexto mês. Após o reforço, a frequência de anticorpos IgG anti rN-RDB e anti-S1 aumentou para 97,4% e 100%, respectivamente. Houve uma queda nos títulos de anticorpos neutralizantes após seis meses da segunda dose (CoronaVac), sendo significativa a diferença de atividade neutralizante frente às variantes Gama e Ômicron após 186 dias da segunda dose. A dose de reforço proporcionou um aumento na atividade neutralizante de 2,4% para 87,2% após 62 dias, com redução para 60% após 151 dias. As correlações entre os testes ELISA e cVNTs foram positivas e moderadas na primeira coleta de soro, tornando-se nulas ao longo do tempo devido à queda dos títulos de anticorpos neutralizantes frente à Omicron. O teste sVNT superestimou a atividade neutralizante em relação ao padrão-ouro (cVNT), e os índices dos testes ELISA e sVNT não se correlacionaram aos títulos de anticorpos neutralizantes ao longo do esquema vacinal. **CONCLUSÃO:** Os testes ELISA IgG (anti-rN+RDB e anti-S1) apresentaram excelente desempenho, especialmente quando ambos os alvos foram analisados em combinação. A análise da dinâmica e extensão de produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 ao longo de 1 ano, durante o primeiro esquema vacinal em São Paulo, Brasil, para COVID-19, indicaram a perda significativa de atividade neutralizante e mudança de moderada a fraca ou nula correlação entre os testes ao longo do tempo frente a variante viral Ômicron. Ainda, os nossos dados contribuem para levar o melhor entendimento sobre a dinâmica de produção de anticorpos com o surgimento de novas VOCs e após o reforço vacinal, como uma das ferramentas norteadoras importantes das medidas de controle e prevenção da COVID-19.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2. COVID-19. Teste sorológico para COVID-19. Testes de neutralização. Vacinas contra COVID-19.

## ABSTRACT

Silva Jr. AR. Detection of SARS-CoV-2 IgG and neutralizing antibodies in healthy individuals after COVID-19 vaccination [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**Introduction:** The COVID-19 pandemic immediately demanded the development, application, and assessment of classical serological methods because they were technically accessible in real time and met the emerging diagnostic needs for SARS-CoV-2. Serological methods allowed us to comprehend the dynamics and extent of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the face of the emergence of Variants of Concern (VOCs), which subsequently influenced the development of vaccines. **Objectives:** Given these facts, the present study aimed to: (1) Evaluate the accuracy and performance of ELISA tests in detecting anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies using control sera; (2) Assess the dynamics of IgG anti-SARS-CoV-2 antibody and neutralizing antibody production in individuals' sera during the vaccination schedule with the Coronavac vaccine and booster with the Pfizer vaccine in São Paulo over a one-year period; (3) Investigate the correlation between anti-S1 and rN+RDB IgG antibodies and neutralizing antibodies detected by conventional viral neutralization test (cVNT) and surrogate neutralization test (sVNT). **Materials and Methods:** A cohort of 41 healthcare professionals from the Faculdade de Medicina of the Universidade de Sao Paulo was followed over the course of one year (March 2021 to March 2022) during the COVID-19 vaccination schedule, with intervals of 32 and 186 days after the second dose of CoronaVac® and after 62 and 150 days of Pfizer® booster immunization. The dynamics of IgG antibody production was assessed using two ELISA tests, one for anti-S1 and another for anti-rN+RDB, whose performance was initially evaluated with 254 control sera. Additionally, the production of neutralizing antibodies against the Gamma, Delta, and Omicron Variants of Concern (VOCs) was measured using the conventional viral neutralization test (cVNT), based on cell culture, and the surrogate virus neutralization test (sVNT), based on the inhibition of ACE2 binding and S1 antigen. **Results:** The anti-S1 and anti-rN+RDB IgG ELISA tests showed high accuracy, with an area under the ROC curve exceeding 0.9. The sensitivity of the ELISA test for anti-rN+RDB IgG antibodies was 96.3%, and for anti-S1 was 94.0%. Specificity values were 96.6% and 98.3%, respectively. Combining the results of both

tests increased sensitivity to 98.0% and specificity to 100%. In the vaccinated population, the frequency of seropositive individuals increased after 32 days, significantly decreasing after the sixth month. After the booster, the frequency of anti-rN-RDB and anti-S1 IgG antibodies increased to 97.4% and 100%, respectively. There was a decline in neutralizing antibody titers six months after the second dose (CoronaVac), with a significant difference in neutralizing activity against the Gamma and Omicron variants after 186 days from the second dose. The booster dose provided an increase in neutralizing activity from 2.4% to 87.2% after 62 days, reducing to 60% after 151 days. Correlations between ELISA tests and cVNTs were positive and moderate in the first serum collection, becoming null over time due to the decline in neutralizing antibody titers against Omicron. The sVNT test overestimated neutralizing activity compared to the gold standard (cVNT), and the indices of ELISA and sVNT tests did not correlate with neutralizing antibody titers throughout the vaccination schedule. **Conclusion:** The IgG ELISA tests (anti-rN+RDB and anti-S1) showed excellent performance, especially when both targets were analyzed in combination. The analysis of the dynamics of anti-SARS-CoV-2 antibody production over one year, during the initial vaccination schedule in São Paulo, Brazil, for COVID-19, indicated a significant loss of neutralizing activity and a shift from moderate to weak or null correlation between the tests over time against the Omicron viral variant. Furthermore, our data contribute to a better understanding of the antibody production dynamics with the emergence of new Variants of Concern (VOCs) and after booster vaccination, serving as an important guiding tool for COVID-19 control and prevention measures.

**Keywords:** SARS-CoV-2. COVID-19. COVID-19 serological testing. Neutralization tests. COVID-19 vaccines.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
ACE2	Receptor da enzima conversora da angiotensina-2
Ac	Anticorpo
AUC	<i>Area under the ROC Curve</i>
CLIA	Quimioluminescência
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CPE	Efeito citopático ( <i>Cytopathic effect</i> )
cVNT	Teste de neutralização viral convencional ou biológico
D.O	Densidade óptica
DMEM	<i>Dulbecco Minimal Essential Medium</i>
DP	Desvio padrão
E	Envelope
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
<i>g</i>	Força G
HCoV	Coronavírus humano ( <i>Human coronavirus</i> )
IC 95%	Intervalo de confiança em 95%
IgG	Imunoglobulina G
IMT-FMUSP	Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
I.R	Índice de Reatividade
i.s	Início dos sintomas
M	Membrana
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>
N	Nucleocapsídeo
nm	Nanômetro
n.s	Não significativo

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>PBS-T</b>	<i>Phosphate Buffered Buffer – Tween 20</i>
<b>PP</b>	Poder preditivo
<b>RBD</b>	<i>Receptor binding domain</i>
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>RT-PCR</b>	Reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
<b>S</b>	Proteína <i>Spike</i>
<b>S1</b>	Subunidade S1 da proteína <i>Spike</i>
<b>SARA</b>	Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto
<b>SARS</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
<b>SARS-CoV</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SLR</b>	Soro limiar de reatividade
<b>sVNT</b>	Teste de neutralização viral sintético
<b>TCB</b>	Tampão carbonato-bicarbonato
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>UTR</b>	Regiões não Traduzidas ( <i>Untranslated Regions</i> )
<b>VN</b>	Verdadeiro negativo
<b>VNT</b>	Teste de neutralização viral ( <i>Viral Neutralization Test</i> )
<b>VOC</b>	Variante de Preocupação ( <i>Variant of Concern</i> )
<b>VP</b>	Verdadeiro positivo
<b>vs.</b>	<i>Versus</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia da ordem <i>Nidovirales</i> .....	3
Figura 2 - Estrutura do coronavírus humano (HCoV) .....	4
Figura 3 - Esquema representativo da proteína Spike do SARS-CoV-2 .....	5
Figura 4 - Estrutura genômica do SARS-CoV-2 .....	6
Figura 5 – Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira.....	8
Figura 6 - Manifestações clínicas da COVID-19 em humanos.....	10
Figura 7 - Mapa de casos cumulativos de COVID-19 no mundo.....	11
Figura 8 - Linha do tempo com a origem da variante Ômicron de SARS-CoV-2 e suas subvariantes (2021 a 2022).....	12
Figura 9 - Variação esperada na detecção de SARS-CoV-2 em diferentes testes diagnósticos. ....	17
Figura 10 - Mecanismo de neutralização viral.....	18
Figura 11 - Fluxograma de atividades que compõem o desenho do estudo .....	27
Figura 12 - Fluxograma dos períodos de coleta de soro dos indivíduos vacinados ..	28
Figura 13 - Exemplo de curva ROC com bons parâmetros de acurácia para um teste laboratorial.....	30
Figura 14 - Esquema ilustrativo da técnica de ELISA .....	32
Figura 15 - Preparo do soro limiar de reatividade do teste ELISA <i>in-house</i> .....	34
Figura 16 - Diagrama explicativo da metodologia comercial <i>cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (sVNT)</i> .....	38
Figura 17 - Representação dos valores $r$ em gráfico de correlação .....	39
Figura 18 - Distribuição do índice de reatividade (I.R) de anticorpos IgG baseado nos respectivos limiares (cut-off) para cada teste na avaliação da sensibilidade. ....	42
Figura 19 - Distribuição do índice de reatividade (I.R) de anticorpos IgG, segundo os respectivos limiares dos testes, para avaliação da especificidade.....	43

Figura 20 - Curva ROC dos testes ELISA IgG anti-rN+RBD e anti-S1, respectivamente. .....	44
Figura 21 - Fluxograma da população elegível para o presente estudo.....	45
Figura 22 - Distribuição do índice de reatividade para anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 (ELISA) nos 4 diferentes tempos.....	50
Figura 23 - <i>Heat map</i> para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 1.....	57
Figura 24 - <i>Heat map</i> para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 2.....	58
Figura 25 - <i>Heat map</i> para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 3.....	59
Figura 26 - <i>Heat map</i> para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 4.....	60
Figura 27 - Distribuição dos I.R ELISA IgG de acordo com o título de anticorpos neutralizantes detectados pelo teste cVNT-Ômicron após as coletas de soro realizadas antes (A, B, C, D) e após o reforço vacinal (E, F, G, H).....	63
Figura 28 - Distribuição do percentual de inibição pelo teste sVNT em seus respectivos títulos de anticorpos neutralizantes para a variante Ômicron (cVNT). ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variantes de Preocupação catalogadas pela OMS.....	12
Tabela 2 - Testes sorológicos realizados em cada coleta.....	38
Tabela 3 - Frequência de positividade para os testes sorológicos nos soros controles de indivíduos doentes. ....	41
Tabela 4 - Frequência de positividade para os testes sorológicos nos soros de controles de indivíduos sadios .....	43
Tabela 5 - Características do grupo de voluntários vacinados incluídos no estudo. .	46
Tabela 6 - Distribuição do número e frequência de soropositivos para anticorpos IgG anti-rN+RDB, anti-S1 e ambos anti- rN+RDB e/ou anti-S1. ....	48
Tabela 7 - Total e título de anticorpos neutralizantes contra as variantes de SARS-CoV-2 em soros de indivíduos após vacinação com a vacina CoronaVac® e reforço com a vacina Pfizer®. ....	52
Tabela 8 – Comparação de dois grupos etários com os títulos de anticorpos neutralizantes para as VOCs de SARS-CoV-2 em quatro diferentes coletas de soro dos indivíduos vacinados com o imunizante CoronaVac® seguido de dose reforço pela vacina Pfizer®. ....	53
Tabela 9 - Comparação de dois grupos etários com a frequência de positividade para anticorpos neutralizantes para as variantes do SARS-CoV-2 em quatro diferentes coletas em indivíduos vacinados com o imunizante CoronaVac® seguido de dose adicional pela vacina Pfizer®. ....	53
Tabela 10 - Frequência de positividade para anticorpos neutralizantes frente às técnicas cVNT com as VOCs circulantes na ocasião e sVNT nos vacinados .....	54
Tabela 11 - Frequência de positividade entre os testes sorológicos e coletas nos vacinados .....	55

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Um breve histórico da COVID-19 e considerações gerais .....	1
1.2 Os coronavírus – classificação .....	2
1.3 Estrutura e genoma do vírus SARS-CoV-2 .....	3
1.4 Patogênese da COVID-19.....	7
1.5 Situação de transmissão no mundo e no Brasil: distribuição e epidemiologia	11
1.6 Diagnóstico laboratorial .....	14
1.6.1 Testes moleculares para detecção de RNA viral e para a pesquisa de antígenos .....	14
1.6.2 Testes sorológicos .....	15
1.7 Prevenção .....	19
1.8 Justificativa.....	20
2 OBJETIVOS .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Desenho do estudo .....	24
3.2 População do estudo - Etapa 1 .....	24
3.3 População do estudo - Etapa 2 .....	25
3.4 Critérios de inclusão.....	25
3.5 Critérios de exclusão .....	25
3.6 Fluxograma de atividades .....	26
3.7 Coleta de amostras dos voluntários .....	28
3.8 Processamento dos soros .....	28
3.9 Análise do desempenho dos testes ELISA IgG rN+RBD e ELISA S1 .....	29
3.9.1 Sensibilidade .....	29
3.9.2 Especificidade .....	29

3.9.3 Curva ROC para avaliação da acurácia dos testes ELISA.....	29
3.10 Aplicação dos testes na população de vacinados .....	31
3.10.1 Caracterização da resposta humoral dos indivíduos vacinados....	31
3.10.2 Teste de detecção de anticorpos IgG anti-nucleoproteína e RBD (RDB + rN-ELISA).....	31
3.10.3 Teste de detecção de anticorpos IgG anti-S1 (S1- ELISA) .....	34
3.11 Teste de Neutralização viral convencional ou biológico (cVNT).....	35
3.11.1 Isolamento viral .....	35
3.11.2 Titulação do vírus .....	36
3.11.3 Descrição da técnica cVNT .....	36
3.12 Teste de neutralização sintético (sVNT).....	37
3.13 Análise de correlação entre os testes sorológicos .....	39
3.11 Análise estatística .....	40
3.12 Considerações éticas .....	40
4 RESULTADOS .....	41
4.1 Parâmetros de desempenho do teste ELISA - anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2 .....	41
4.1.1 Sensibilidade ELISA IgG anti- rN + RBD e anti- S1 .....	41
4.1.2 Especificidade dos testes anti- rN + RBD e anti-S1.....	42
4.1.3 Análise da acurácia dos testes ELISA IgG pela Curva ROC e AUC .....	44
4.2 População elegível .....	45
4.3 Caracterização da população de vacinados do estudo .....	46
4.4 Teste ELISA: perfil de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados .....	47
4.4.1 Dinâmica e extensão da resposta de anticorpos IgG ao longo do esquema vacinal.....	47

4.4.2 Índice de reatividade (I.R) - Anti-rN + RBD .....	48
4.4.3 Índice de reatividade (I.R) - Anti-S1 .....	48
4.5 Teste cVNT: dinâmica da frequência e título de anticorpos neutralizantes frente às VOCs ao longo do esquema vacinal .....	51
4.6 Comparação da frequência de positividade de anticorpos neutralizantes entre sVNT e cVNT para as VOCs na análise dos soros dos vacinados .....	54
4.7 Comparação das frequências de positividade entre os testes sorológicos ELISA IgG (anti-rN+RDB e anti-S1), cVNT e sVNT (Gama, Delta e Ômicron) na análise dos soros dos vacinados.....	55
4.8 Análise da correlação entre os testes sorológicos em relação ao teste padrão-ouro avaliada ao longo do esquema vacinal .....	56
4.8.1 Coleta 1 .....	57
4.8.2 Coleta 2.....	58
4.8.3 Coleta 3.....	59
4.8.4 Coleta 4.....	60
4.9 Análise descritiva dos títulos de anticorpos totais neutralizantes por cVNT Ômicron e os resultados dos testes ELISA e sVNT na análise dos soros dos vacinados	61
4.9.1 cVNT e ELISA .....	61
5 DISCUSSÃO .....	65
6 CONCLUSÃO.....	72
7 REFERÊNCIAS.....	73
8 ANEXOS .....	97
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	97
8.2 Formulário utilizado para obtenção de dados dos indivíduos.....	100
8.3 Valores de p para as comparações entre cada um dos testes listados no subitem 4.6 .....	101
8.4 Publicação referente ao atual estudo .....	102
8.5 Publicação referente ao atual estudo .....	103

8.6 Apresentação de resumo em congresso .....	104
---	-----

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Um breve histórico da COVID-19 e considerações gerais

Passaram-se quase quatro anos desde o início da pandemia da doença designada COVID-19, doença causada por um coronavírus (CoV) e identificada pela primeira vez em 2019, como declarado pela Organização Mundial da Saúde em 11 de março de 2020 (1). Os primeiros *clusters* de infecção pelo seu agente etiológico denominado SARS-CoV-2 foram identificados na província de Wuhan, na China (2–6). Este novo vírus, SARS-CoV-2, foi filogeneticamente reconhecido como similar ao SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave, do inglês SARS). Esses vírus pertencem ao subgênero *Sarbecovirus* dos betacoronavírus, infectam predominantemente morcegos (7,8). Por este motivo, a hipótese é de que o SARS-CoV-2 originou-se evolutivamente deste animal. Assim como o SARS-CoV descrito entre 2002 e 2004 na primeira epidemia de coronavírus de relevância para saúde pública, o SARS-CoV-2 emergiu a partir de mutações provavelmente resultantes de seleção natural sofridas em um isolado viral originário de morcegos (9,10).

Com o avanço da pandemia, o alerta se dirigiu a vigilância da circulação de novas variantes de SARS-CoV-2 ao longo de tempo (11–15). As variantes designadas Alfa, Beta, Gama e Delta foram tomando à atenção das autoridades sanitárias, principalmente em relação ao risco de impacto na efetividade das vacinas, que foram introduzidas no final do ano de 2020 (9,16). A variante viral Ômicron tornou-se, desde 2021, a principal variante de preocupação (17). Em 26 de novembro de 2021, a OMS (Organização Mundial da Saúde) designou a variante Ômicron B.1.1.529 como variante de preocupação (em inglês VOC – *variant of concern*), com base nas recomendações do Grupo Técnico Consultivo para acompanhamento da evolução viral (*WHO's Technical Advisory Group on Virus Evolution*) (18). A Ômicron é uma variante altamente divergente, com um grande número de mutações na proteína *Spike*, levando a necessidade de estudos para avaliar as condições associadas a possibilidade de um escape vacinal e maior transmissibilidade.

A doença COVID-19 como uma emergência em Saúde Pública de importância internacional foi mantida no mais alto nível de alerta até quase três anos depois do início da pandemia. Em 05 de maio de 2023, o diretor-geral da OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus, declarou o fim do estado de emergência de saúde pública de

importância internacional em alto nível. No entanto, a disseminação da doença ao redor do mundo mantém o estado de pandemia, com uma mortalidade acumulada de 708.021 no Brasil (19) (<https://infoms.saude.gov.br/> acesso em 08 de dezembro de 2023) e alcançando 6.985.964 mortes acumuladas no mundo (20).

Alguns entraves dificultaram a ação imediata para o controle da expansão da doença COVID-19 ao redor do mundo. Uma delas, refere-se a alta incidência de infecções assintomáticas e oligossintomáticas, aliada à irregularidade na disponibilidade de testes confirmatórios e às fragilidades dos sistemas de informação, que somaram imprecisões aos dados sobre a incidência cumulativa de COVID-19 na população durante fases iniciais da pandemia, o que prejudicou a tomada de decisões oportunamente pelas autoridades sanitárias sobre a orientação da população em relação às medidas de controle, como distanciamento social, controle de viajantes, uso de máscaras e esquemas de vacinação dos grupos prioritários. Apesar dos entraves iniciais, um total de 13,5 bilhões de doses de vacinas foram aplicadas no mundo todo até o momento (20,21).

A busca de estratégias acessíveis com o objetivo de compreender a dinâmica de propagação do SARS-CoV-2 e da COVID-19 é importante para orientar a implementação de políticas públicas sustentáveis, incluindo os esquemas de imunização. Dentre as estratégias de entendimento da epidemiologia da doença, os estudos soropidemiológicos se destacam como uma abordagem de aplicação tecnicamente acessível em situação de crise, aliados às ferramentas moleculares de vigilância global das variantes virais.

No tópico abaixo, daremos ênfase a análise da estrutura do SARS-CoV-2, para a melhor compreensão da evolução de seu genoma e de sua variabilidade viral.

## **1.2 Os coronavírus – classificação**

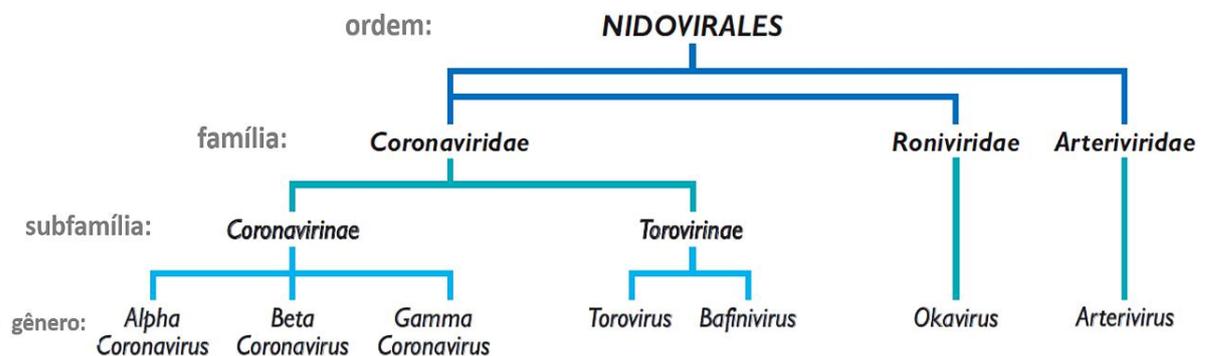
Os coronavírus são pertencentes à família *Coronaviridae*, da ordem *Nidovirales* e capazes de infectar ambos humanos e animais, incluindo bovinos, suínos, galinhas, gatos, cavalos, camelos, roedores, morcegos e cobras (22–24). Um total de seis coronavírus foram relatados como causadores de doenças em humanos, sendo eles: duas cepas de *Alphacoronavirus* (HCoV-229E e HKU-NL63) e quatro da subfamília *Betacoronavirus* (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV).

Quatro destes vírus (229E, OC43, NL63 e HKU1) tipicamente causam sintomas leves, estes que remetem a uma gripe comum (25,26).

Porém os outros 2 membros já causaram outras doenças importantes no passado, são eles: SARS-CoV (27,28), e MERS-CoV (29,30). Um sétimo vírus desta família foi descrito em dezembro de 2019 na região de Wuhan, na China (5), e recebeu o nome de SARS-CoV-2.

A imagem abaixo (Figura 1) representa a taxonomia dos vírus aqui citados.

Figura 1 - Taxonomia da ordem *Nidovirales*



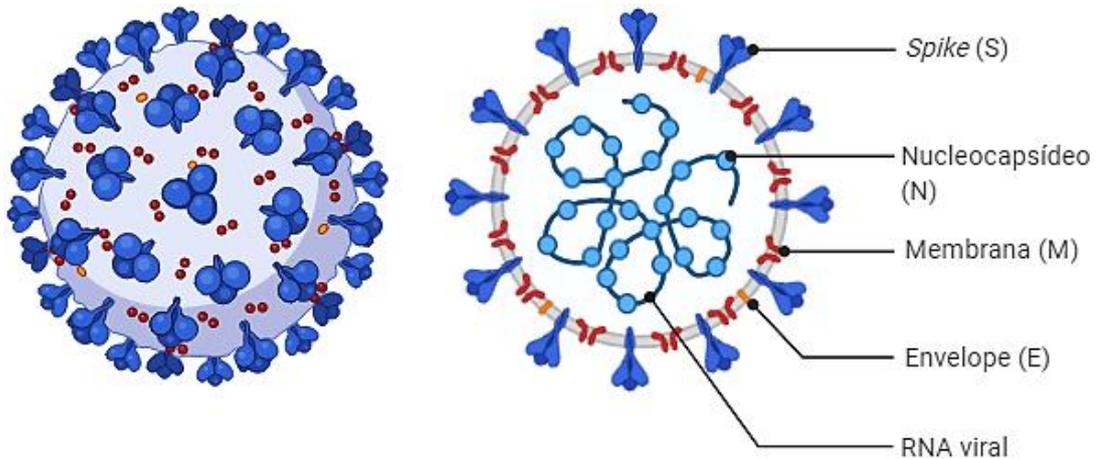
Fonte: Adaptado de KNIPE; HOWLEY, 2006 (31)

### 1.3 Estrutura e genoma do vírus SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 é envelopado, esférico e apresenta diâmetro entre 70 a 110 nm (nanômetros) (32,33). Todos os coronavírus tem semelhanças na sua estrutura e genoma, dos quais: 16 proteínas não-estruturais (nsp1 até nsp16), codificadas pela *Open Reading Frame* (ORF) 1a/b na terminação 5', e em seguida, as proteínas estruturais *Spike* (S), envelope (E), membrana (M), e nucleocapsídeo (N), as quais são codificadas por outras ORFs na terminação 3'. A proteína S é responsável pela ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira, resultando na fusão e na consequente entrada do vírus na célula. A proteína M é a mais abundante e define o formato do envelope viral. A proteína E é a menor de todas as proteínas estruturais e participa da montagem e liberação da partícula viral. Por fim, a proteína N é a única que se liga diretamente ao RNA (ácido ribonucleico) genômico viral e também está envolvida na montagem e liberação da partícula viral (34,35).

A imagem abaixo (Figura 2) representa a estrutura geral de um coronavírus humano, e a figura seguinte (Figura 3) ilustra, de forma mais específica a proteína *Spike*, presente na superfície do vírus (36).

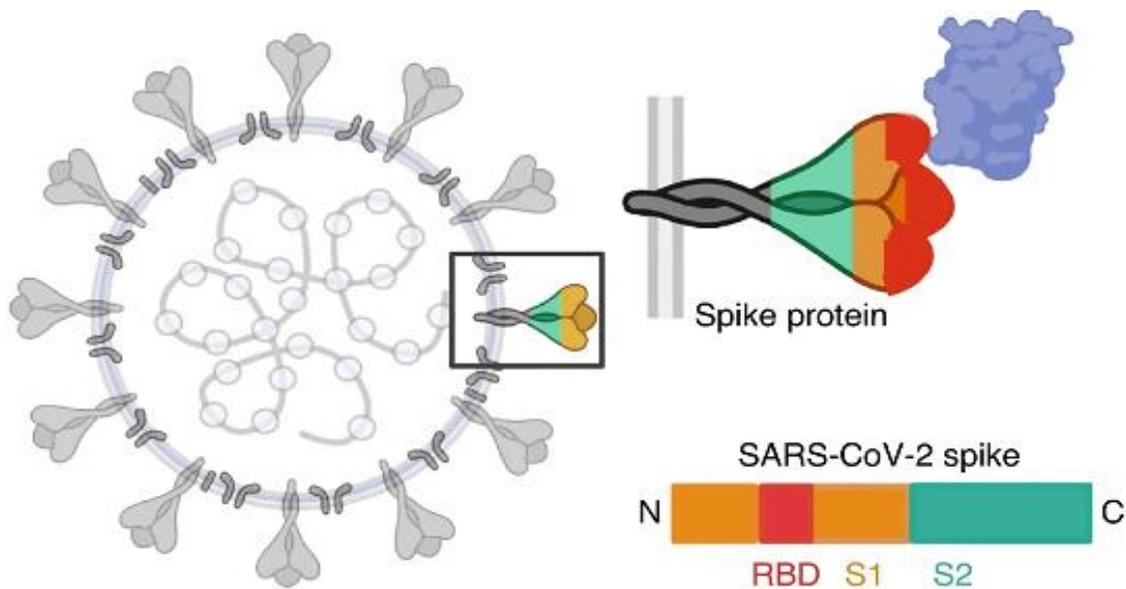
Figura 2 - Estrutura do coronavírus humano (HCoV)



Fonte: Imagem elaborada no software Biorender.com

O termo “coronavírus” surgiu pois, quando observados sob microscopia eletrônica, os vírions se assemelham a uma coroa (*corona* em Latim) por conta das projeções na sua membrana (31,37). O primeiro coronavírus humano (HCoV) foi isolado em 1965 de secreção nasal de pacientes com a gripe comum, e esta cepa recebeu o nome de B814 (38).

Figura 3 - Esquema representativo da proteína Spike do SARS-CoV-2

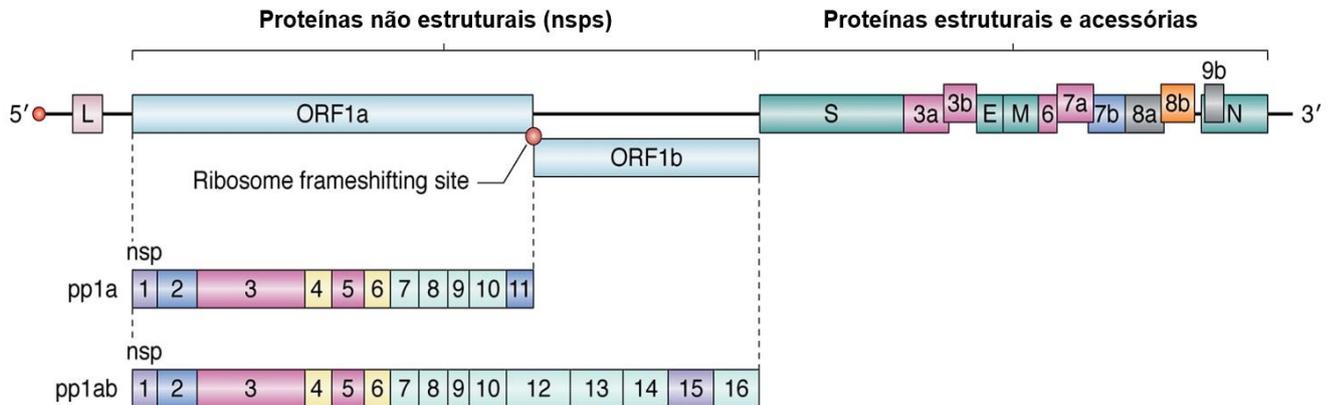


Fonte: Adaptado de HUO *et. al*, 2020 (36)

Em relação ao seu genoma, o vírus SARS-CoV-2 apresenta RNA de fita única, de sentido positivo e com genoma entre 26 a 32 quilobases de extensão (39,40). O RNA genômico apresenta Cap (estrutura de guanina modificada) na extremidade 5', é poliadenilado e possui duas Regiões não Traduzidas (UTR, do inglês *Untranslated Regions*) nas extremidades 5' e 3'. Logo após a 5' UTR, ocupando cerca de dois terços do genoma, estão as ORFs 1a e 1b, que são traduzidas nas poliproteínas pp1a e pp1ab, precursoras de 16 proteínas não estruturais, envolvidas na transcrição e replicação do vírus. O restante do genoma codifica para as proteínas estruturais S, E, M e N, além de pelo menos seis proteínas acessórias, com funções ainda desconhecidas (41,42).

Na imagem abaixo (Figura 4) encontra-se a estrutura genômica do SARS-CoV-2, subdivida em proteínas não estruturais, e estruturais ou acessórias (43).

Figura 4 - Estrutura genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de HARTENIAN, 2020 (43)

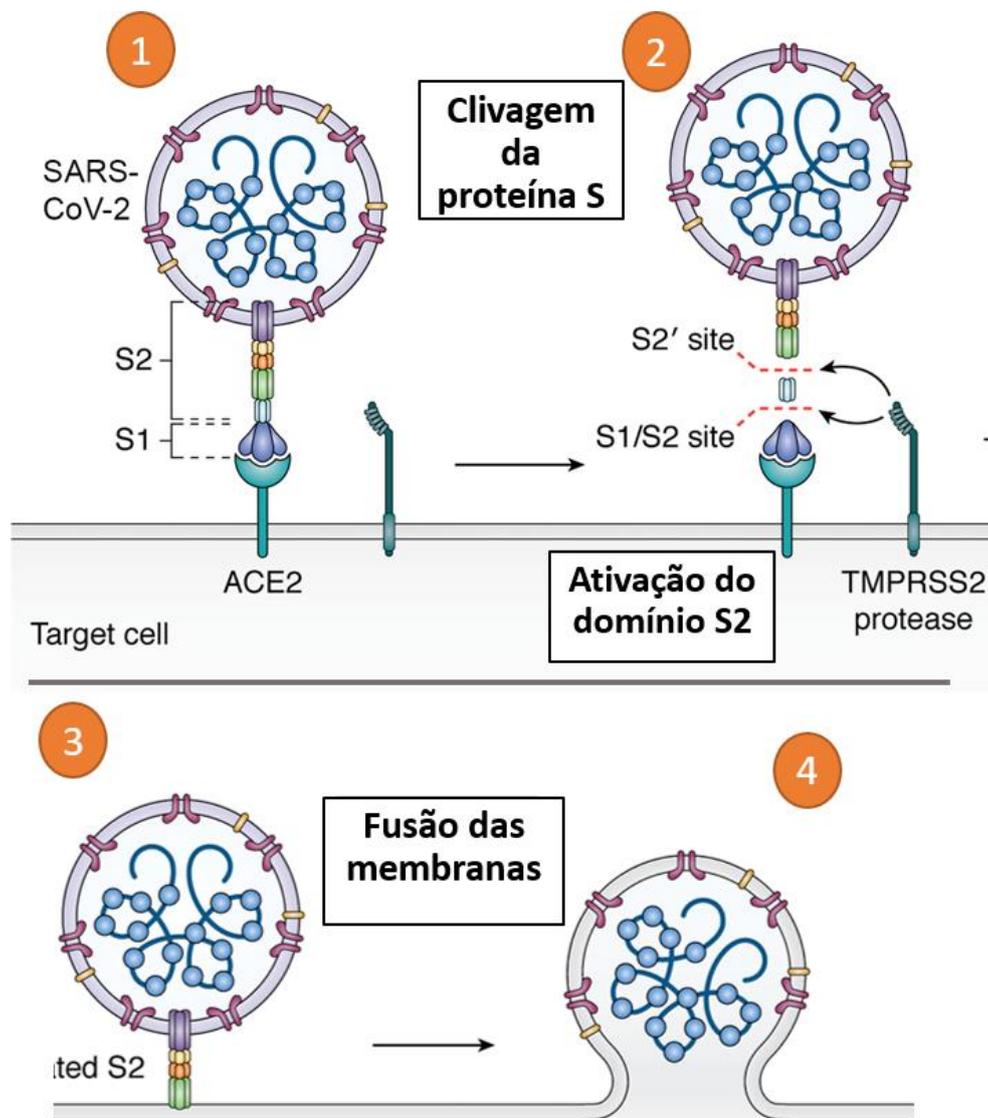
Uma característica inerente do genoma dos coronavírus é sua capacidade de produzir altas taxas de mutação, a despeito de possuírem mecanismos complexos de revisão e reparo de erros de replicação, sem precedentes na biologia de outros vírus de RNA (44). Seus mecanismos de variabilidade genética promovem a sobrevivência e seleção de vírus recombinantes em diferentes populações (26).

#### 1.4 Patogênese da COVID-19

Como o mecanismo de patogênese se inicia com a entrada do vírus na célula, Zhou e colaboradores conduziram um estudo a fim de verificar se o mesmo padrão de entrada na célula pelos coronavírus também ocorria com o novo coronavírus, SARS-CoV-2. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que o SARS-CoV-2 de fato utiliza o receptor ACE2 como mecanismo de entrada nas células hospedeiras (9).

O vírus se liga ao receptor ACE2 da célula hospedeira por meio do domínio ligante do receptor (RBD), que compõe a proteína *Spike*. O RBD então sofre ação proteolítica por uma protease humana, a TMPRSS2. Desta forma, a proteína é clivada em dois domínios, S1 e S2. O último é então ativado, e se torna responsável pela fusão das membranas e entrada do material genético do vírus na célula (43,45). A figura abaixo (Figura 5) representa o mecanismo de invasão do vírus na célula hospedeira.

Figura 5 – Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira



Fonte: Adaptado de HARTENIAN *et al.*, 2020 (43)

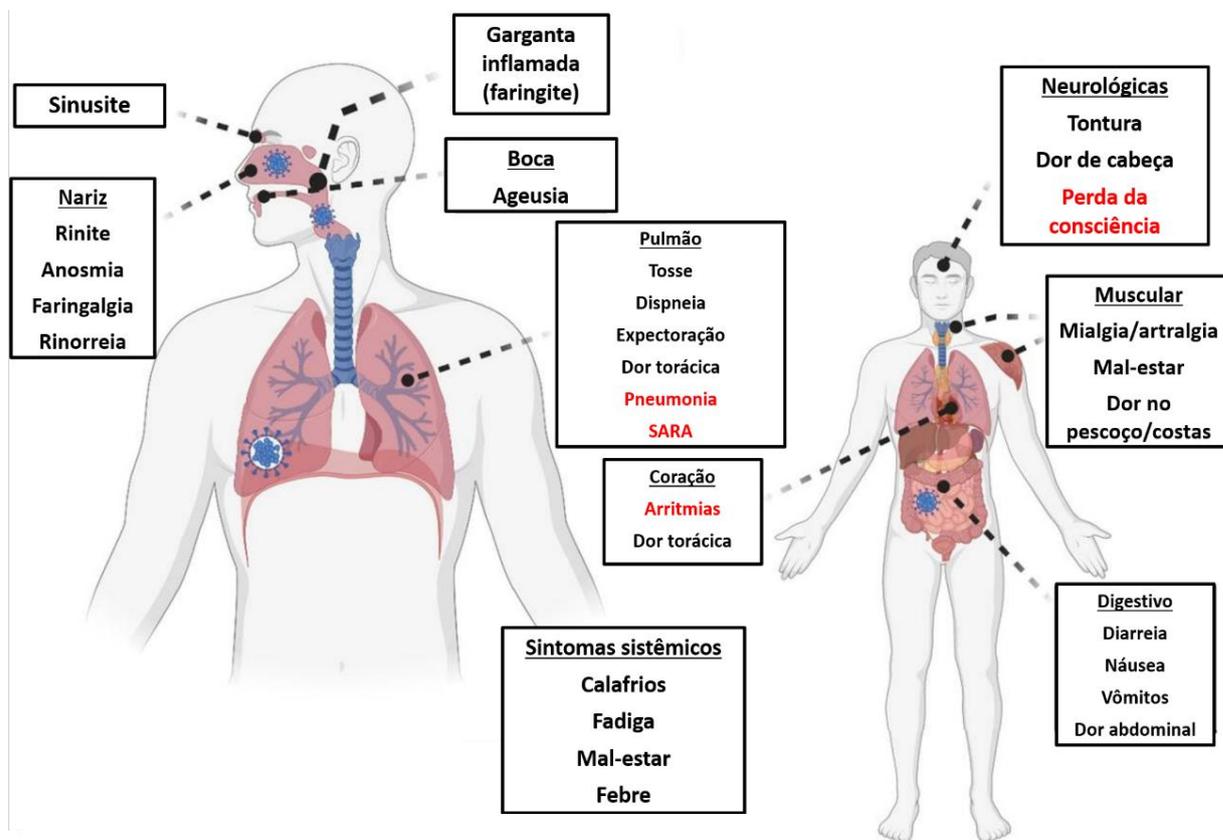
Uma importante relação entre carga viral e gravidade da doença já foi descrita na literatura em um estudo retrospectivo (46). Em outro estudo, pesquisadores relataram achados patológicos em pacientes com COVID-19, tais como presença de trombose e microangiopatia (obstrução de pequenos vasos) nas veias pulmonares (47). 184 pacientes com COVID-19 e pneumonia definida em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de hospitais universitários holandeses foram monitorados, e destes 31% tiveram complicações trombóticas (48). Zheng e colaboradores identificaram em

sua metanálise correlacionaram os níveis de dímero D, um marcador de trombose, com a severidade da COVID-19 (49).

Pacientes com a doença apresentam sintomas que se assemelham a uma pneumonia viral: febre, tosse, desconforto ao respirar, e em casos mais graves dispneia e infiltrado pulmonar bilateral (5,50). Em casos graves a COVID-19 pode progredir rapidamente para Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto (SARA), choque séptico, acidose metabólica de difícil manejo clínico, sangramento e disfunções na coagulação (51).

A figura 6 (abaixo) representa os sintomas que a COVID-19 pode gerar no organismo. Os sintomas destacados em vermelho, de forma geral, estão mais presentes em indivíduos com a forma mais severa da doença (52–56).

Figura 6 - Manifestações clínicas da COVID-19 em humanos.



Em vermelho: exemplos de manifestações graves; **\*SARA** = Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto

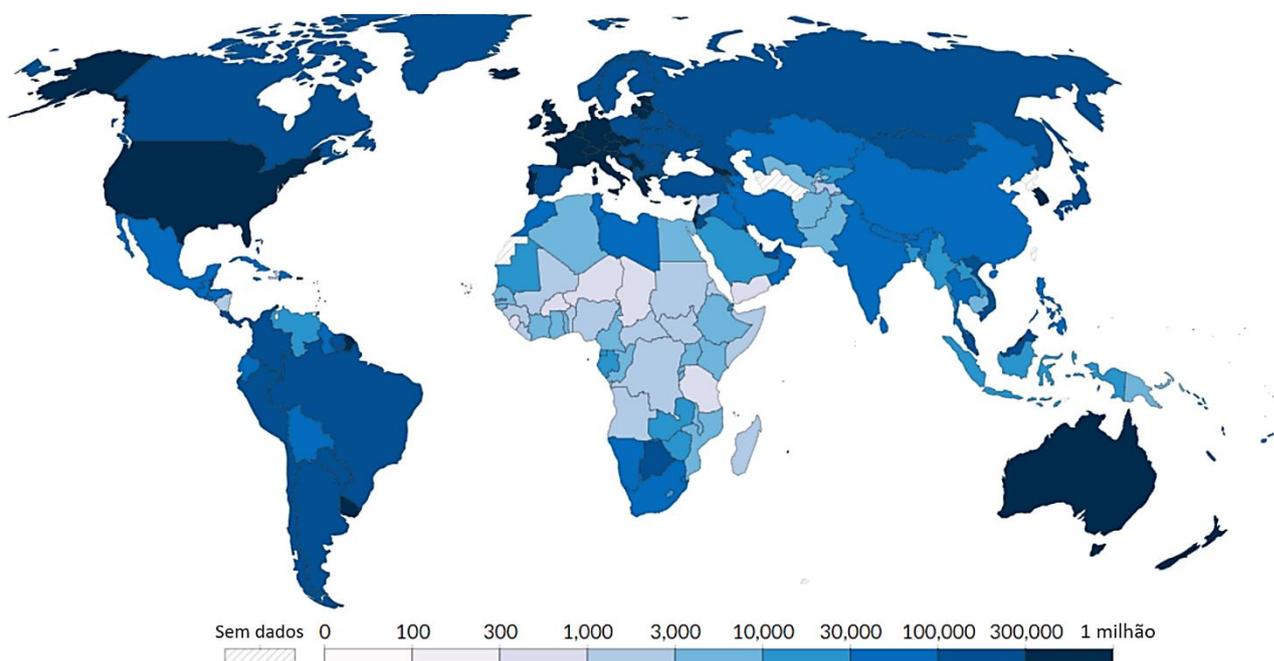
Fonte: Adaptado de HARRISON; LIN; WANG, 2020 (57)

### 1.5 Situação de transmissão no mundo e no Brasil: distribuição e epidemiologia

Desde o início da pandemia de COVID-19 até janeiro de 2024, de acordo com os dados fornecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde), o número de pessoas que desenvolveram COVID-19 ultrapassou 770 milhões no mundo todo (20), e no Brasil estes números atingiram a marca de 38 milhões de casos acumulados da doença e 708.739 óbitos confirmados sendo o sexto país com mais casos e o segundo em número de mortes (20). De acordo com dados obtidos portal do Ministério da Saúde no dia 17 de janeiro de 2024 a taxa de letalidade desta doença é de 1,9% (19).

No Estado de São Paulo o número de acometidos pela COVID-19 alcançou 6.766.000 indivíduos, segundo dados da Fundação Seade (Sistema Estadual de Análise de Dados) (58). Todos os dados citados nesta seção foram consultados no dia 17 de janeiro de 2024. Na figura abaixo (Figura 7), encontra-se o mapa global dos casos acumulados de COVID-19 até a presente data (21).

Figura 7 - Mapa de casos cumulativos de COVID-19 no mundo.



Fonte: Our World in Data (21). Acessado em 16 de janeiro de 2024.

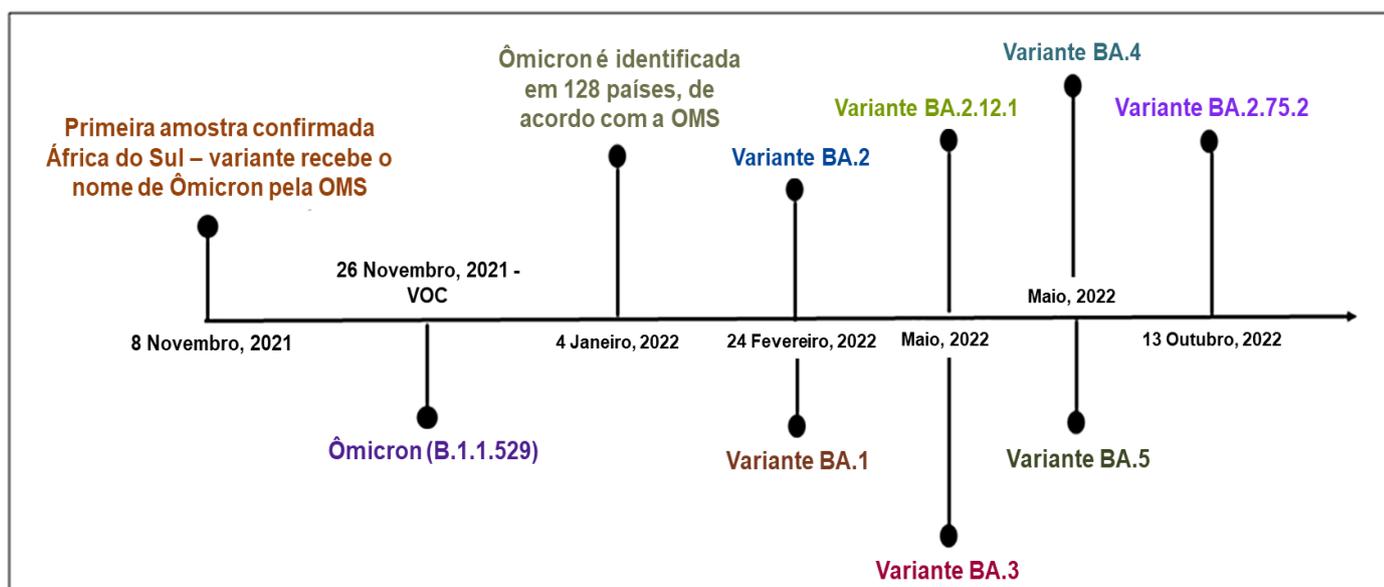
Na Tabela 1 (abaixo) encontram-se as variantes de preocupação Alfa, Beta, Gama, Delta, Ômicron, em ordem cronológica, com a sua data de designação e locais nos quais foram documentadas. A Figura 8 (também abaixo) apresenta a linha de tempo em que as principais subvariantes de Ômicron foram primeiramente descritas, indicando a predominância de sua circulação a partir de novembro de 2021.

Tabela 1 - Variantes de Preocupação catalogadas pela OMS.

Nome OMS	Linhagem	Primeiras amostras documentadas	Data de designação
Alfa	B.1.1.7	Reino Unido, Set-2020	18/12/2020
Beta	B.1.351	África do Sul, Mai-2020	18/12/2020
Gama	P.1	Brasil, Nov-2020	11/01/2021
Delta	B.1.617.2	Índia, Out-2020	11/05/2021
Ômicron	B.1.1.529	Diversos países, Nov-2021	26/11/2021

Fonte: Adaptado de World Health Organization (WHO, 2023a.) (17)

Figura 8 - Linha do tempo com a origem da variante Ômicron de SARS-CoV-2 e suas subvariantes (2021 a 2022).



Fonte: Adaptado de CHATTERJEE *et al.*, 2023 (59)

Em janeiro de 2021, a variante Gama do SARS-CoV-2 foi identificada em Manaus, Brasil (14). Até julho de 2021 era a cepa mais frequente sequenciada neste país (60). A variante Gama apresenta transmissibilidade aumentada, tem mutações acumuladas associadas à diminuição da soroneutralização *in vitro* e parece apresentar uma possível associação com aumento da gravidade da doença (61). No cenário de uma grande epidemia associada à variante Gama em São Paulo, o estado mais populoso do Brasil, a vacinação com Sinovac-CoronaVac® foi associada à redução de casos sintomáticos de COVID-19, internações hospitalares e óbitos em adultos com idade igual ou superior a 70 anos em um ambiente com transmissão da variante Gama. A proteção da vacina foi, no entanto, baixa até a conclusão do regime de duas doses, e observou-se que a efetividade da vacina diminuiu com o aumento da idade entre essa população idosa (62).

Em 24 de novembro de 2021 uma nova variante do vírus SARS-CoV-2 foi reportada pela Organização Mundial da Saúde, recebeu o nome de Ômicron (B.1.1.529) e teve seu status designado como variante de preocupação (63). A variante Ômicron contém diversas mutações na proteína *Spike*, tornando muitas vacinas menos eficazes (64–66). A variante Ômicron também é altamente transmissível, ultrapassando a Delta como a variante dominante em muitos países. Muitos estudos tem apontado a necessidade global de reforços (“*booster*”) vacinais para combater o impacto de variantes emergentes. Diversos países que usaram anteriormente a vacina Sinovac-CoronaVac® reforçam a ideia de que a variante Ômicron está associada ao escape imunológico de vacinas ou imunidade induzida por infecção, e que o “*booster*” vacinal demonstra ser efetivo contra o impacto destas variantes virais (67).

Dados recentes de vigilância globais sugerem que as infecções por SARS-CoV-2 são geradas principalmente pela variante Ômicron e suas subvariantes. Várias mutações foram descritas recentemente, e as mesmas levam ao escape da resposta por anticorpos produzida pela vacinação prévia ou infecções naturais (68,69). A circulação de subvariantes recombinantes da Ômicron, que podem ter surgido ou ainda podem emergir, aumenta as preocupações sobre seu possível impacto nas características epidemiológicas da doença e na saúde humana. (68,70)

## 1.6 Diagnóstico laboratorial

Os testes de diagnóstico laboratorial têm sido fundamentais para determinar a dispersão desse vírus na população em tempo real e também para o esclarecimento relativo ao grau de exposição das populações a esse vírus.

Esses testes podem ser divididos em testes de detecção do RNA viral (71–74) e ensaios sorológicos que detectam imunoglobulinas específicas dirigidas à estruturas do vírus (75–77).

### ***1.6.1 Testes moleculares para detecção de RNA viral e para a pesquisa de antígenos***

A detecção molecular de ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 é o padrão ouro para a confirmação diagnóstica da infecção (71). Os testes de RT-PCR (reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase) são amplamente utilizados para a detecção, diagnóstico e quantificação do SARS-CoV-2 (72–74). Este procedimento é essencial para o monitoramento de pacientes infectados, uma vez que é possível observar a carga viral do indivíduo e relacioná-la à evolução do paciente (76,78). A redução nos níveis de RNA detectáveis ocorre ao longo da infecção e a partir de 10 a 11 dias após o início dos sintomas, estes níveis tendem a ficar indetectáveis. Porém o RNA viral infectante pode ser detectado até cerca de vários meses após o início da infecção (52,76,79).

Em parte, o diagnóstico da doença por meio da detecção do RNA viral em secreções respiratórias, não só orienta o manejo clínico individual, mas inclusive visa nortear a adoção de estratégias de isolamento para bloquear a transmissão comunitária, prevenir tanto quanto possível a dispersão das variantes e em consequência, garantir um maior sucesso dos planos de imunizações atuais.

Atualmente, existe também outra metodologia amplamente empregada para o rastreamento do vírus, que recebe o nome de teste rápido de antígeno. Esta ferramenta é importante na detecção precoce do agente etiológico (80), e consiste em identificar antígenos virais na amostra do indivíduo. É um método com princípio baseado em imunocromatografia, rápido e mais acessível se comparado a outras plataformas, porém apresenta menor sensibilidade analítica em relação ao teste padrão ouro (RT-PCR) (80–82).

### **1.6.2 Testes sorológicos**

Os testes sorológicos são especialmente úteis para avaliar a dinâmica de exposição das comunidades ao agente natural ou vacinal por meio da medida da presença de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2. Da mesma forma, os testes destinados à avaliação da capacidade neutralizante dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 são importantes estratégias para estimar a susceptibilidade ao quadro grave da COVID-19 de uma população (83–93).

#### **1.6.2.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)**

Os ensaios imunoenzimáticos são amplamente empregados para investigar a presença de anticorpos para as proteínas N (nucleocapsídeo) ou S (*Spike*) de SARS-CoV-2, principalmente em inquéritos soropidemiológicos ou estudos retrospectivos (GUO et al., 2020; TO et al., 2020; ZHANG et al., 2020). A pesquisa de anticorpos anti-SARS-CoV-2 pelo teste ELISA pode ser considerada amplamente acessível em relação aos testes comerciais disponíveis com o uso recente de plataformas robustas e marcadores ultrasensíveis, como os testes automatizados por quimioluminescência (94–106).

O método ELISA tem a possibilidade de ser realizado em áreas remotas, requer equipamentos de pequeno porte, reagentes mais versáteis e atende à alta demanda de testagem em um curto espaço de tempo. O método destinado à pesquisa de anticorpos da classe IgG são ferramentas úteis para conhecer a prevalência pregressa de uma infecção (107), ainda sendo recomendado para o acompanhamento do sistema imune de indivíduos convalescentes da COVID-19 e para avaliar a resposta imune humoral frente a vacinação de uma população (101,108).

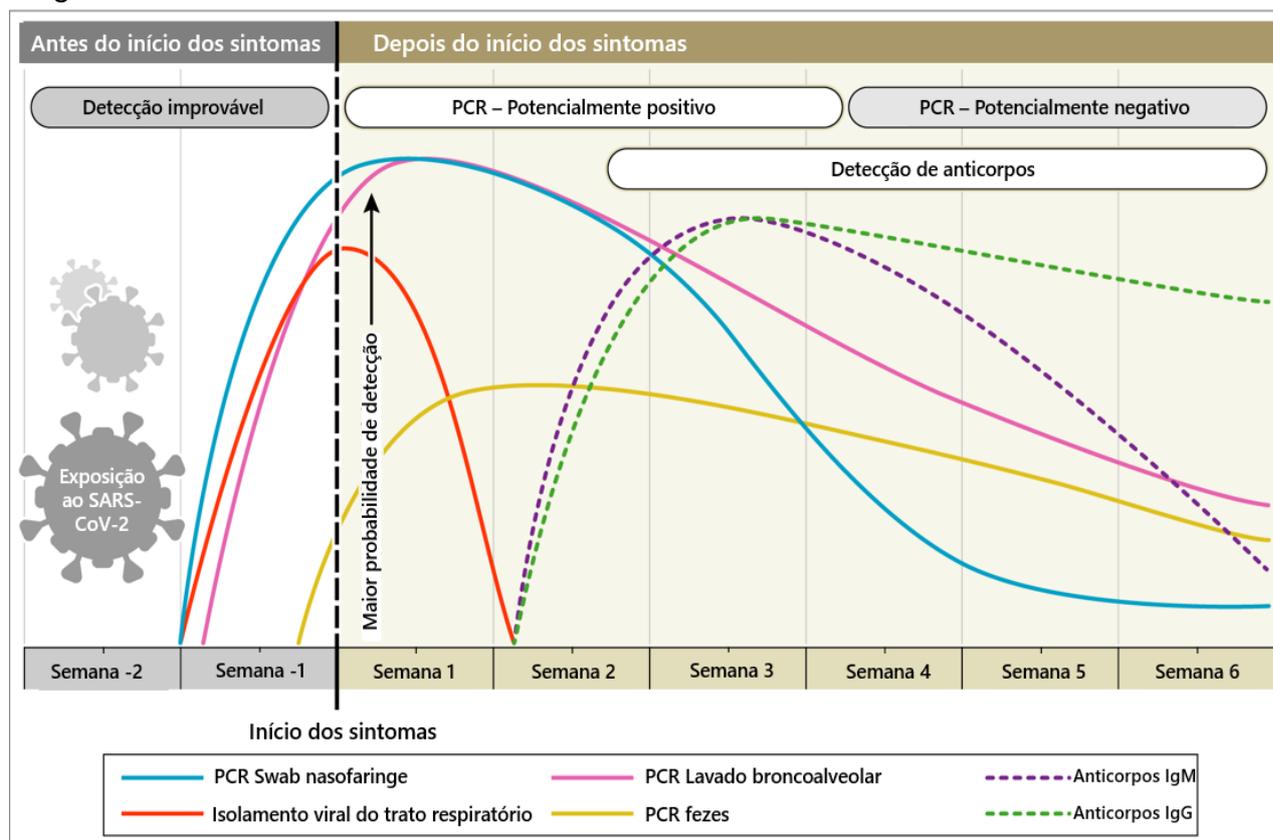
Desde os estudos iniciais, a análise de anticorpos dirigidos à proteína do nucleocapsídeo foi alvo importante dos estudos sorológicos pela sua alta imunogenicidade, além de ser altamente específico e não apresentar reatividade cruzada com outros coronavírus (109–113). Ainda, há grande interesse em formular ensaios imunológicos baseados na detecção de anticorpos para a fração RBD e da proteína *Spike* (subunidade S1) devido a ação fundamental destes na interação e entrada do vírus na célula hospedeira, além de ser os principais alvos dos anticorpos neutralizantes, compondo os principais antígenos para induzir anticorpos anti-SARS-CoV e anti-SARS-CoV-2 (114–119).

Patel e colaboradores (2021) avaliaram o desempenho de testes comerciais para diferentes alvos a partir de uma casuística significativa e observaram uma correlação positiva de ambos anti-*Spike* e anti-nucleoproteína em relação aos títulos de anticorpos neutralizantes (120). Segundo esses autores, a seleção de plasmas de COVID-19 de indivíduos convalescentes poderia se beneficiar da estratégia de usar testes de ótima acurácia para detectar anticorpos para esses alvos, visto que ambos os anticorpos são presumivelmente dirigidos à depuração viral (121–124).

O emprego de um teste com alta acurácia para o sorodiagnóstico de SARS-CoV-2 não necessariamente apresenta alta acurácia para detectar anticorpos neutralizantes em indivíduos convalescentes, que foi uma estratégia emergencial no início da pandemia. No entanto, os estudos que avaliaram o desempenho dos testes são capazes de apontar, pelo menos, dois principais entraves para essa aplicação: a limitação de desempenho de parte significativa dos testes comerciais disponíveis e a falta de acesso as plataformas comerciais denominadas de alto desempenho. Os resultados dos imunoenaios que sejam de bom desempenho podem ser incorporados a outros preditores da presença de títulos altos de anticorpos neutralizantes, diante da ausência ou inacessibilidade de plataformas ou protocolos de alto rendimento para detecção de anticorpos neutralizantes (120).

Na imagem abaixo (Figura 9), encontra-se de forma ilustrativa a cinética de positividade dos diferentes testes de diagnóstico molecular e materiais biológicos (swab nasofaríngeo, lavado broncoalveolar e fezes) e sorológicos nas diferentes fases de exposição e infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Figura 9 - Variação esperada na detecção de SARS-CoV-2 em diferentes testes diagnósticos.



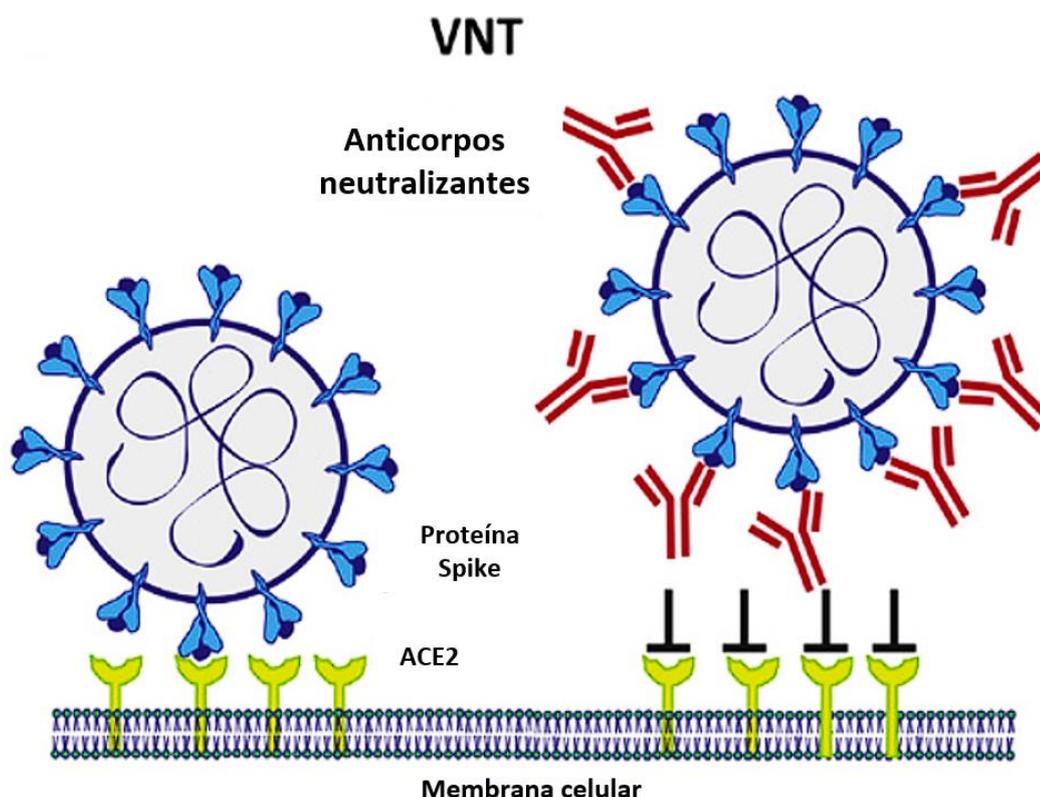
Fonte: Adaptado de SETHURAMAN *et al.*, 2020 (125)

### 1.6.2.2 Testes de neutralização viral

Os ensaios de avaliação da capacidade neutralizante de anticorpos são conhecidos como teste de neutralização viral (da sigla em inglês, VNT). Embora, o VNT avalie apenas parte do que se tem definido como imunidade, sua medida pode ser um marcador importante para avaliar a eficiência ou qualidade dos anticorpos específicos gerados.

A figura abaixo (Figura 10) ilustra o mecanismo de neutralização viral efetuado pelos anticorpos do indivíduo, à direita (126).

Figura 10 - Mecanismo de neutralização viral.



Fonte: Adaptado de HAMMERSCHMIDT *et. al*, 2022 (126)

O VNT exige infraestrutura rígida de biossegurança para investigar anticorpos que neutralizam vírus ativos na presença de uma cultura de células. São anticorpos que interagem com estruturas da superfície do SARS-CoV-2, em especial a proteína *Spike*, impedindo que o vírus interaja com receptores nas células do hospedeiro, o que levaria à infecção das mesmas (127,128). Existem ainda propostas comerciais de avaliação da presença de anticorpos anti-*Spike* com propriedade neutralizante das pseudopartículas virais (129–132).

O VNT, em geral, é um teste dispendioso em termos de tempo e infraestrutura requeridos, não são amplamente empregados, porém são indispensáveis como potencial indicador de proteção dada pela medida da capacidade de neutralização dos anticorpos totais no soro de indivíduos vacinados ou previamente infectados pelo vírus SARS-CoV-2.

## 1.7 Prevenção

Atualmente, a vacinação é considerada a principal estratégia para controle da pandemia de COVID-19 e reduzir o quadro alarmante que afetou o mundo todo. O programa de vacinação foi iniciado no mundo com o oferecimento de quatro vacinas principais, cada uma com eficácia e imunogenicidade diferentes, tornando desafiador medir a estimativa do nível de proteção coletiva da população vacinada. Em um primeiro momento, nove vacinas candidatas à COVID-19 baseadas na cepa original de Wuhan-Hu-1 se encontravam na vanguarda da pesquisa de vacinas. Todas as nove tiveram uma eficácia superior a 50% contra a doença sintomática de COVID-19: NVX-CoV2373 (~96%), BNT162b2 (~95%), mRNA-1273 (~94%), Sputnik V (~92%), AZD1222 (~81%), BBIBP-CorV (~79%), Covaxina (~78%), Ad26.CoV.S (~66%) e CoronaVac (~51%). No entanto, a efetividade da vacina foi constantemente ameaçada pelo rápido surgimento e disseminação de variantes preocupantes de SARS-CoV-2 (VOCs) que podem escapar de anticorpos neutralizantes e/ou imunidade mediada por células. Embora muitas vacinas para a COVID-19 tenham sido desenvolvidas a partir de 2021, ainda são necessárias vacinas eficazes adicionais para atender à demanda global (32).

Atualmente, 70,6% da população mundial recebeu pelo menos uma dose vacinal para COVID-19. Porém, o cenário em países de baixa renda é diferente. Apenas 32,9% da população nestes países recebeu uma dose vacinal (21).

Neste estudo as nossas análises se concentraram no esquema vacinal com a vacina Sinovac-CoronaVac®, esta composta pela partícula viral do SARS-CoV-2 completa e inativada, produzida pela Sinovac Life Sciences Co., Ltd. (Pequim, China) (133,134), seguido de dose adicional pela vacina BNT162b2, também conhecida como COMIRNATY®, aqui neste trabalho também referida apenas por Pfizer® (Nova Iorque, EUA), produzida pela empresa de mesmo nome e que consiste em uma nanopartícula lipídica com a sequência total de RNAm (RNA mensageiro) da proteína *Spike* inserida nela (135–137).

## 1.8 Justificativa

O atual estudo começou com a preocupação do desenvolvimento de testes sorológicos visto que o cenário vigente era de ausência de vacinas e carência de testes para elucidar a dinâmica da produção e persistência dos anticorpos frente à COVID-19. Atualmente, os inquéritos soropidemiológicos têm fornecido um panorama coletivo da exposição prévia ao SARS-CoV-2 em áreas específicas ou grupos populacionais, mas ainda há restrições de sua aplicação em termos de acesso as diferentes tecnologias disponíveis. Os testes sorológicos são essenciais para: (1) o diagnóstico complementar da infecção pregressa, (2) a caracterização da dinâmica e persistência da produção de anticorpos ao longo do tempo a partir da exposição à infecção natural ou vacinal. Conseqüentemente, os dados obtidos a partir das ferramentas sorológicas são norteadores do planejamento das intervenções em saúde pública. Desde o início da pandemia, diversas formas de inquéritos sorológicos têm sido praticadas para avaliar o impacto da dinâmica de transmissão viral e planejar as ações de controle. Há ainda a necessidade de testes acessíveis que possam ser usados como alternativas às plataformas comerciais de custo ainda elevado, usualmente restritas ao uso nos grandes centros urbanos.

Aliado a identificação da presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em inquéritos epidemiológicos, a análise da medição de anticorpos neutralizantes é importante no entendimento do nível de suscetibilidade de uma população às

manifestações graves da COVID-19, especialmente em relação ao impacto das variantes de SARS-CoV-2 circulantes, que são as VOCs (variantes de preocupação).

A partir de janeiro de 2021, a introdução da vacinação contra a COVID-19 foi iniciada no Brasil como uma estratégia urgente de limitar a pandemia de COVID-19. Este estudo começou antes do surgimento de variantes do SARS-CoV-2 com múltiplas mutações, levantando preocupações sobre a efetividade da resposta imune induzida pela vacinação em conter sua propagação. A capacidade de neutralização contra as variantes Gama, Delta e Ômicron dos soros de indivíduos imunizados com a vacina Sinovac-CoronaVac® despertaram o interesse global, especialmente no Brasil, em que há um vasto território para a cobertura vacinal. Tornou-se então cada vez mais relevante compor um conjunto de dados para a compreensão da dinâmica de transmissão de SARS-CoV-2 frente as diferentes intervenções adotadas entre as diferentes regiões no mundo e seus diferentes esquemas de imunização durante e após a pandemia de COVID-19.

A proposta do atual estudo foi baseada em avaliar o desempenho e aplicar o teste para pesquisa de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 baseado na detecção de anticorpos dirigidos à diferentes alvos antigênicos virais, especialmente um teste *in-house* de desempenho adequado, com versatilidade de uso de reagentes alternativos, e que pudesse ser acessível e empregado em situações de crise como diante de uma pandemia. Dessa forma, avaliamos a resposta de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 contra diferentes epítomos antigênicos, que são preservados em vacinas inativadas do tipo da CoronaVac®. Essa proposta foi elaborada no início da pandemia com a pesquisa de anticorpos anti-nucleoproteína (138) e estendeu-se até o presente trabalho em um teste ELISA *in-house* baseado na detecção simultânea de anticorpos contra os alvos da nucleoproteína (N) e RDB (*receptor-binding domain*). Além disso, um protocolo de ELISA comercial foi também avaliado e empregado, este voltado para anticorpos IgG anti-S1, que se refere a subunidade da proteína *Spike* da superfície viral e também considerada o principal alvo de anticorpos neutralizantes.

Adicionalmente, o nosso estudo se propôs a caracterizar a resposta de anticorpos IgG e anticorpos neutralizantes seguindo o esquema vacinal por duas doses da vacina CoronaVac® e após a dose “*booster*” (Pfizer) em uma população de indivíduos não previamente expostos a infecção por SARS-CoV-2. Os anticorpos

totais neutralizantes foram avaliados pela técnica de VNT convencional a partir de cultura viral e por um teste VNT sintético obtido comercialmente.

## 2 OBJETIVOS

### Principal

- Detecção de anticorpos IgG e anticorpos totais neutralizantes anti-SARS-CoV-2 após vacinação para COVID-19 em indivíduos sem exposição prévia à infecção por SARS-CoV-2 em diferentes momentos do esquema de vacinação pela CoronaVac® e após reforço com Pfizer®.

### Secundários

- Avaliação do desempenho de testes imunoenzimáticos quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG dirigidos às proteínas recombinantes rN+RBD e S1 do vírus SARS-CoV-2.

- Caracterização da resposta de anticorpos IgG após vacinação para COVID-19 (Sinovac-CoronaVac® e reforço com a vacina Pfizer®) na população de indivíduos não previamente expostos à infecção natural a partir da aplicação dos testes desenvolvidos;

- Detecção de anticorpos neutralizantes na população de indivíduos vacinados não expostos a infecção natural por meio de testes de neutralização viral convencional (cVNT) e sintético (sVNT);

- Avaliar a correlação entre anticorpos anti-S1 e rN+RDB e anticorpos neutralizantes detectados pelo teste VNT sintético (sVNT) em relação ao padrão-ouro (cVNT)

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Desenho do estudo

O estudo foi realizado em duas etapas.

#### Etapa 1

Voltada ao desenvolvimento de um teste ELISA *in-house* para detecção de anticorpos IgG dirigidos às proteínas recombinantes rN+RBD e avaliação do desempenho de um teste ELISA dirigido à proteína recombinante S1 do vírus SARS-CoV-2 em relação ao teste *in-house*

#### Etapa 2

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, longitudinal, desenvolvido para a caracterização da extensão da resposta de anticorpos IgG e de anticorpos totais neutralizantes a partir de uma casuística de conveniência de soros de 41 indivíduos voluntários na campanha de vacinação para COVID-19 em São Paulo dos funcionários em atividade no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 3.2 População do estudo - Etapa 1

#### **Soros controles para avaliação dos testes ELISA IgG**

O desempenho das técnicas de pesquisa de anticorpos IgG anti-SARS-CoV2 (ELISA-IgG rN+RBD e ELISA-IgG S1) foi avaliado quanto a sensibilidade e especificidade e acurácia por meio de amostras controles da soroteca do laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, proveniente de indivíduos com histórico de COVID-19 e de indivíduos pré-pandemia, como descrito a seguir:

**Soro controle positivo - indivíduos previamente expostos:** para avaliar a sensibilidade dos testes ELISA a partir de uma casuística de conveniência de 134 amostras de soro de indivíduos com histórico de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) em hospitais terciários de São Paulo, decorrente das manifestações clínicas de COVID-19 entre 20 a 61 dias do início dos sintomas (i.s.) e infecção confirmada por RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, soros coletados entre o período de maio a junho de 2020.

**Soros controles negativos - indivíduos sadios pré-epidemia:** na etapa de avaliação do parâmetro de especificidade dos testes de ELISA, uma casuística de conveniência de 120 amostras de soro de indivíduos sadios do período anterior à pandemia da COVID-19.

### **3.3 População do estudo - Etapa 2**

A população do estudo foi composta por 41 indivíduos vacinados que foram caracterizados quanto a resposta de anticorpos IgG anti-rN+RDB e anti-S1 e anticorpos totais neutralizantes. Estes indivíduos eram funcionários em atividade durante o período da pandemia no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT-FMUSP). O estudo ocorreu entre março de 2021 a março 2022.

Todos os funcionários do Instituto de Medicina Tropical operaram em trabalho presencial ou no sistema de rodízio presencial durante a pandemia. Foram soronegativos previamente ao estudo para IgG anti-SARS-CoV-2 por dois testes, um método comercial disponível aos funcionários (Abbott® ARCHITECT i1000SR), na ocasião, pelo Hospital das Clínicas da FMUSP e por um protocolo *in-house* validado no pico da pandemia no laboratório de Virologia do IMTSP-FMUSP (138).

### **3.4 Critérios de inclusão**

Indivíduos não expostos a infecção natural por SARS-CoV-2 e soronegativos para anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, imediatamente anterior ao início do estudo atual e que se mantiveram RT-PCR negativos e/ou sem manifestação de sintomas da COVID-19 durante o período de estudo.

Dados sobre os testes moleculares para SARS-CoV-2 foram coletados do banco de dados do laboratório de Virologia, assim como dados demográficos, clínico e epidemiológicos dos participantes em esquema de vacinação, coletados por meio de um questionário padronizado, conforme Anexo 8.2.

### **3.5 Critérios de exclusão**

1 - Teste prévio confirmatório de SARS-CoV-2 RT-PCR positivo e/ou sorologia positiva antes do início do estudo ou durante sua realização, 2 - Voluntários incluídos que no decorrer do estudo receberam outras vacinas que não a Sinovac-CoronaVac® (vírus inativado) e reforço por Pfizer® (vacina de RNAm), 3 – Profissionais que se

encontravam em trabalho remoto, 4 – Indivíduos que não se encontraram disponíveis em todas as coletas.

### **3.6 Fluxograma de atividades**

#### **Etapa 1 do Estudo**

Para estudar a resposta de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, primeiramente avaliamos o desempenho de dois testes ELISA, aplicados para detecção dos anticorpos IgG, tanto anti-S1 e quanto anti-rN+RDB, em relação à capacidade de discriminar verdadeiros positivos (teste de sensibilidade) e negativos (teste de especificidade) por meio de um painel de soros controles do laboratório de Virologia – IMT-FMUSP.

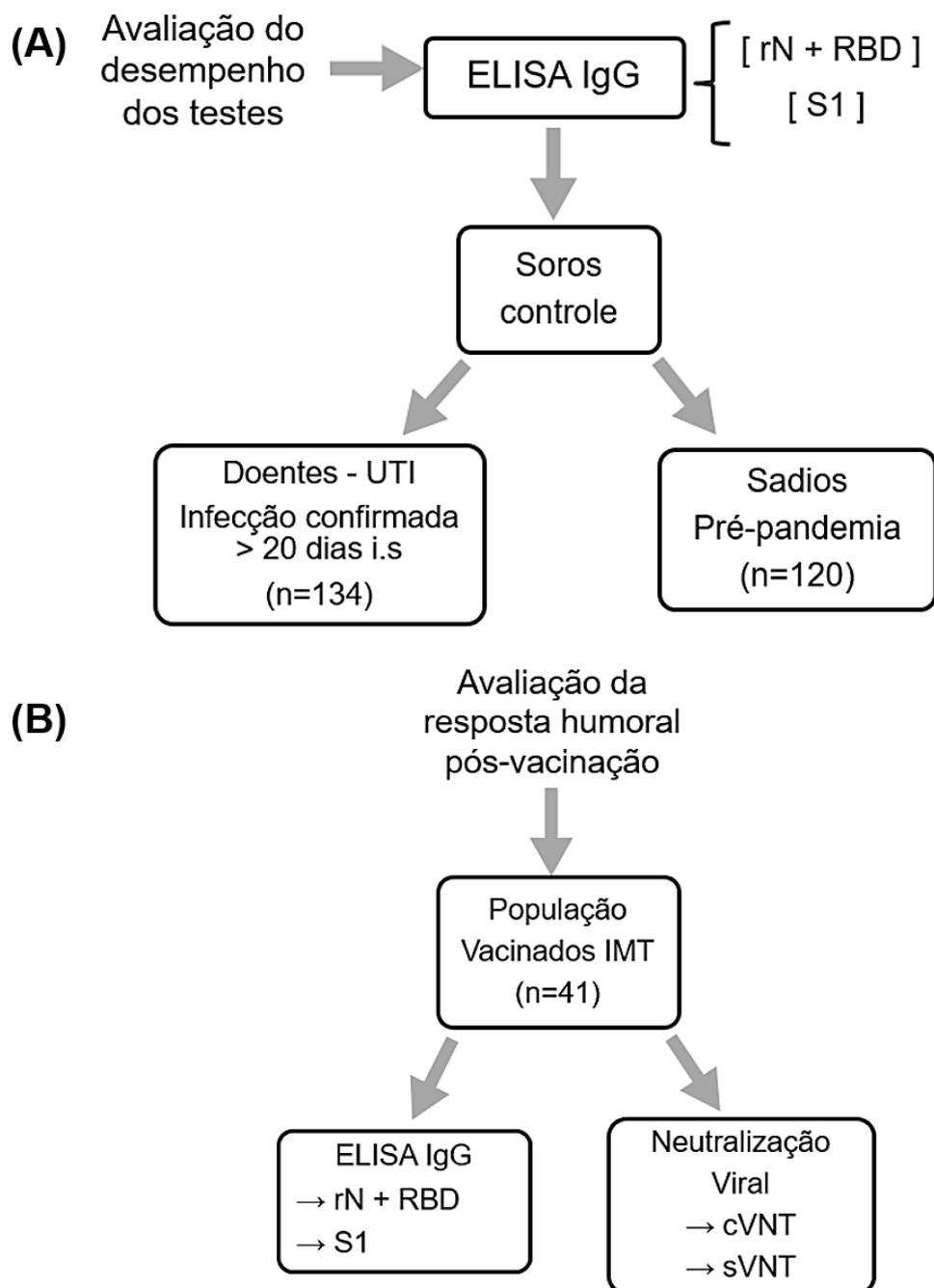
O esquema sumarizado de atividades que compõem o desenho do estudo para a avaliação do desempenho dos testes ELISA de pesquisa de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente a soros controles foi sumarizado na Figura 11 A (abaixo).

#### **Etapa 2 do Estudo**

Posteriormente, os soros dos 41 voluntários vacinados foram avaliados quanto à resposta de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 para ambas as formulações de antígenos recombinantes (anti-rN+RDB e anti-S1). Ainda, para avaliar a resposta de anticorpos totais neutralizantes, dois testes de neutralização viral foram empregados dois protocolos. O primeiro deles foi baseado no protocolo a partir de cultura viral (cVNT) previamente validado do Laboratório de Virologia – FMUSP e em um protocolo de pesquisa de anticorpos neutralizantes baseado no princípio de um teste ELISA de inibição com antígenos sintéticos (sVNT).

O esquema de atividades que compõem o desenho do estudo da avaliação da resposta de anticorpos dos 41 indivíduos vacinados foi sumarizado na Figura 11, seção B.

Figura 11 - Fluxograma de atividades que compõem o desenho do estudo



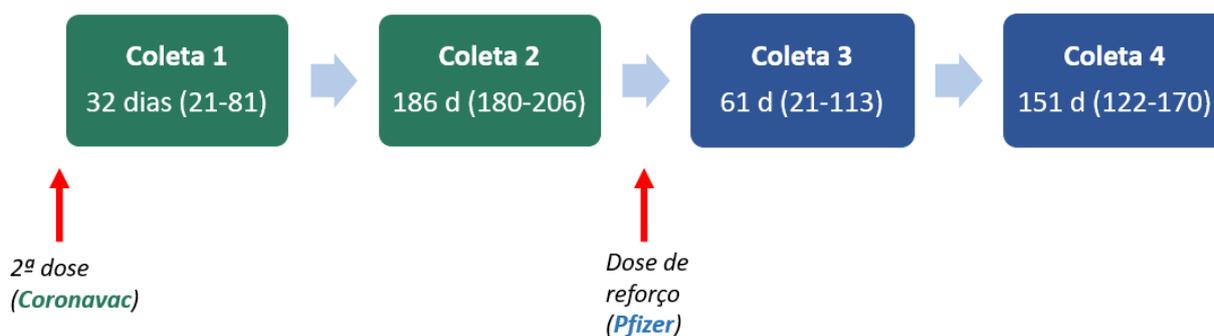
Legenda: **(A)** Etapa 1: Avaliação do desempenho e desenvolvimento do teste de pesquisa de anticorpos IgG *in-house* (ELISA IgG anti-rN+RDB) e teste comercial (ELISA IgG anti-S1) frente a soros controles previamente caracterizados. **(B)** Etapa 2: Avaliação da resposta de anticorpos IgG para SARS-CoV-2 anti-rN+RDB e anti-S1 e anticorpos totais neutralizantes frente a soros de indivíduos após segunda dose e reforço da vacina para COVID-19, conforme esquema de vacinação inicial adotado em São Paulo, Brasil, no período de março/2021 a

março/2022 aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (FMUSP) elegíveis para o estudo.

### 3.7 Coleta de amostras dos voluntários

Foram coletadas 4 amostras de soro de cada um dos voluntários entre março de 2021 a março de 2022 a partir da segunda dose e primeiro reforço, segundo esquema de vacinação feito em São Paulo, Brasil. Durante o estudo, os indivíduos receberam duas doses da vacina Sinovac-Coronavac® a partir de janeiro de 2021 e a primeira dose de reforço do imunizante Pfizer® a partir de outubro de 2021. Os indivíduos tiveram soros coletados em quatro ocasiões entre março de 2021 a março de 2022, segundo esquematizado na Figura 12 (abaixo).

Figura 12 - Fluxograma dos períodos de coleta de soro dos indivíduos vacinados



Legenda: As coletas de soro (1 a 4) estão apresentadas com mediana de dias (mínimo e máximo) e número de indivíduos elegíveis dentro dos critérios de inclusão para as análises sorológicas (ELISA e testes de neutralização viral). d = dias

### 3.8 Processamento dos soros

As amostras de sangue foram coletadas em tubos *Vacutainer*® (BD, New Jersey, EUA) sem anticoagulante e com gel separador. Em seguida, recebidas no laboratório, submetidas à centrifugação a 800 x g durante 10 minutos para a separação do soro. Por último, alíquotas de 500 µl foram preparadas e armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

### **3.9 Análise do desempenho dos testes ELISA IgG rN+RBD e ELISA S1**

Na primeira etapa do trabalho, os dados de sensibilidade e especificidade foram calculados de acordo com parâmetros estabelecidos previamente (107).

#### **3.9.1 Sensibilidade**

Este parâmetro foi definido pela porcentagem de resultados verdadeiros positivos em uma população de indivíduos doentes (107). Para este estudo, avaliamos as amostras de soros controles de indivíduos sabidamente com histórico de COVID-19 há mais de 20 dias (hospitalizados, > 20 dias do início dos sintomas, n=134), a fim de verificar o parâmetro de sensibilidade do teste. A sensibilidade foi calculada pela frequência de positividade do teste frente aos soros controles do grupo de indivíduos doentes.

#### **3.9.2 Especificidade**

A especificidade foi definida pela porcentagem em que um paciente sadio, não doente ter o seu resultado negativo (não detectável) para um determinado teste (107). Para avaliar a especificidade, avaliamos a frequência de positividade do teste frente aos soros controles de indivíduos sabidamente não expostos a COVID-19, coletados no período pré-epidemia (Grupo 2 – n=120), dada pela relação do número de testes positivos em relação ao total de amostras controle.

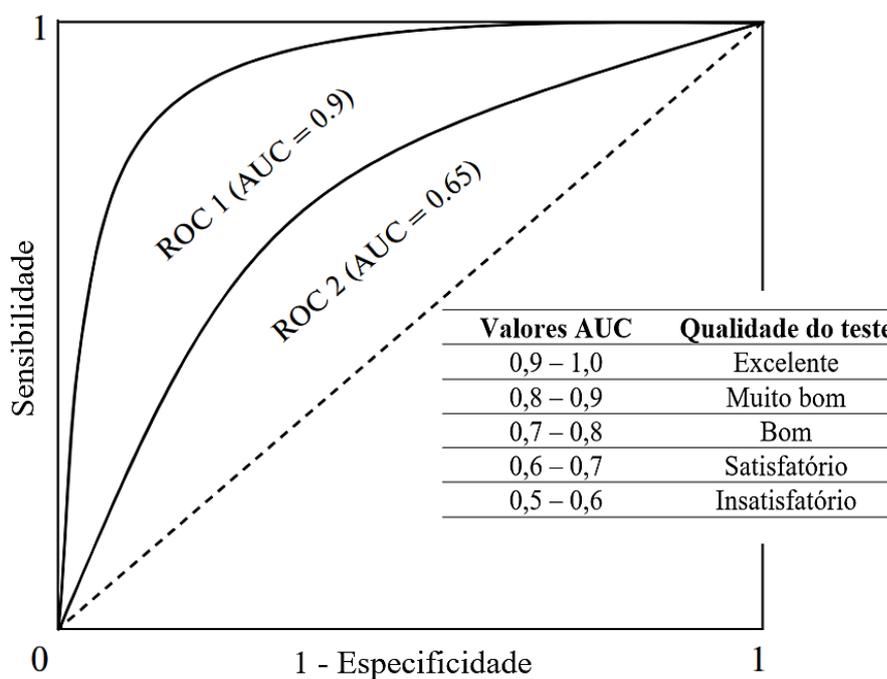
#### **3.9.3 Curva ROC para avaliação da acurácia dos testes ELISA**

A curva ROC (do inglês *Receiver operator characteristic curve*) foi usada para apresentar a relação entre a sensibilidade (verdadeiros positivos) e a especificidade (verdadeiros negativos) dos testes de ELISA IgG ao longo de um contínuo de valores de *cut-off* da análise das densidades óticas (D.O) dos soros controles sadios (n=120) e doentes (n=134). A Área sob a curva ROC (AUC) foi usada para medir o desempenho do modelo de previsão, pelo cálculo da área sob a curva ROC. O AUC (do inglês *Area under the curve*) está ligado ao poder preditivo (PP) de acordo com a seguinte fórmula:  $PP = 2 * AUC - 1$ . A área abaixo da curva ROC é um dos índices

mais utilizados para apresentar a "qualidade" da curva. O valor do AUC varia de 0,0 até 1,0 e o limiar entre a classe é 0,5. Ou seja, acima desse limite, o algoritmo classifica em uma classe e abaixo na outra classe. Quanto maior o AUC, melhor o teste em discriminar verdadeiros positivos e negativos.

De forma geral, os valores da AUC são interpretados como: 0,5 a 0,6 (insatisfatório), 0,6 a 0,7 (satisfatório), 0,7 a 0,8 (bom), 0,8 a 0,9 (muito bom), 0,9 a 1,0 (excelente) (139–142). Na figura abaixo (Figura 13) encontra-se uma exemplificação de uma curva ROC ideal e seus parâmetros adequados (143).

Figura 13 - Exemplo de curva ROC com bons parâmetros de acurácia para um teste laboratorial



Fonte: Adaptado de TRIFONOVA *et al.*, 2012 (143)

### **3.10 Aplicação dos testes na população de vacinados**

#### **3.10.1 Caracterização da resposta humoral dos indivíduos vacinados**

Na etapa seguinte, os testes ELISA para pesquisa de anticorpos IgG foram aplicados ao longo de 4 coletas de soro disponíveis dos 41 indivíduos vacinados entre março de 2021 a março de 2022. A primeira coleta foi feita após a média de 32 dias da segunda dose do imunizante da CoronaVac®; a segunda coleta, 186 dias (média) após a segunda dose da mesma vacina; a coleta 3 foi realizada 61 dias após a dose de reforço pelo imunizante da Pfizer®; por último, a quarta coleta foi feita após 151 dias da terceira dose pelo mesmo imunizante.

A resposta anticórpica IgG anti-SARS-CoV-2 do grupo de vacinados foi feita pelos testes de ELISA com antígenos recombinantes e pelo método de neutralização por VNT avaliados em cultura viral. O cVNT foi feito com as VOCs prevalentes em cada ocasião das coletas. Para a realização do sVNT (sintético), as análises foram restritas aos soros das coletas 1 e 3 (antes e após o reforço).

#### **3.10.2 Teste de detecção de anticorpos IgG anti-nucleoproteína e RBD (RDB + rN-ELISA)**

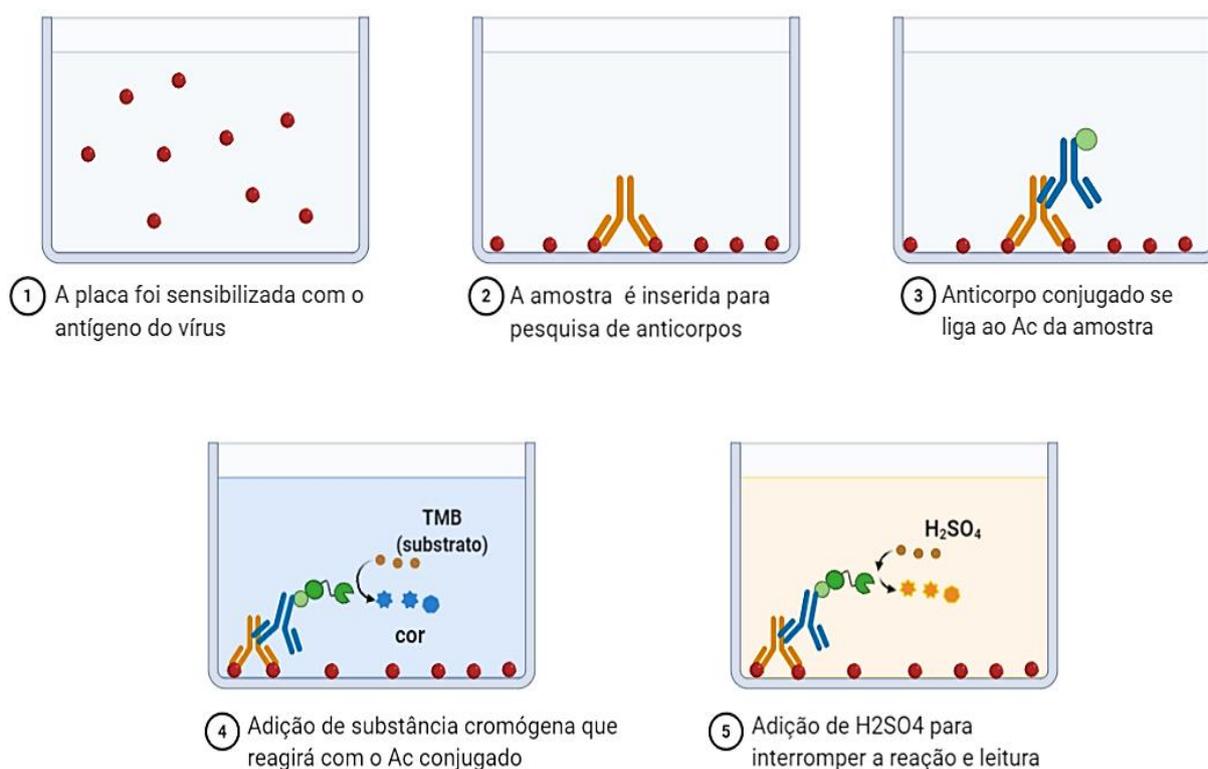
O protocolo foi elaborado utilizando o método ELISA baseado em proteínas recombinantes para detectar anticorpos da classe IgG específicos para o vírus SARS-CoV-2. Microplacas *PolySorp* NUNC de 96 poços (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas com os antígenos recombinantes da nucleoproteína (rN) e da região RBD (*Receptor Binding Domain*) da proteína *Spike* (S) do SARS-CoV-2, gerados em vetores de expressão de *E.coli* com medição de pureza superior a 95%, conforme indicado pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração ótima dos antígenos, diluições dos soros e do anticorpo conjugado anti-IgG foram determinadas por meio de titulações em bloco. As placas foram então sensibilizadas com a proteínas recombinantes (rN e RBD) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M e incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight* (cerca de 18 horas).

Após cada etapa de incubação, as placas foram lavadas com tampão fosfato contendo 0,05% de *Tween 20* (PBS-T). As placas em seguida foram bloqueadas com a solução PBS-T contendo 5% de leite desnatado durante 2 horas a 24°C. As

amostras de soro foram diluídas em solução de PBS-T com 2% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. Em seguida as placas foram incubadas com um anticorpo conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (Sigma Aldrich, San Louis, MO, USA) também por 1 h a 37°C. A mistura contendo o cromógeno TMB e o substrato  $H_2O_2$  (Siemens Healthcare®, Marburg, Germany) foram aplicados nos poços da placa por 15 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica (D.O) das amostras foi então mensurada a 450/650 nm (nanômetros) em um espectrofotômetro para placas de ELISA.

A figura abaixo (Figura 14) ilustra o princípio do método descrito neste tópico.

Figura 14 - Esquema ilustrativo da técnica de ELISA



Fonte: Imagem elaborada no software BioRender.com

### **Definição do *cut-off* ou limiar de reatividade ELISA rN+RBD**

O valor do *cut-off* para este ELISA foi determinado pela média das densidades ópticas mais 3 vezes o desvio padrão (DP) de 120 amostras de soro de indivíduos saudáveis obtidas no período pré-pandemia da COVID-19.

Dois controles, um positivo e um negativo, além de um soro limiar de reatividade (SLR – este com a D.O igual ao valor do *cut-off*) foram adicionados a cada uma das reações de ELISA.

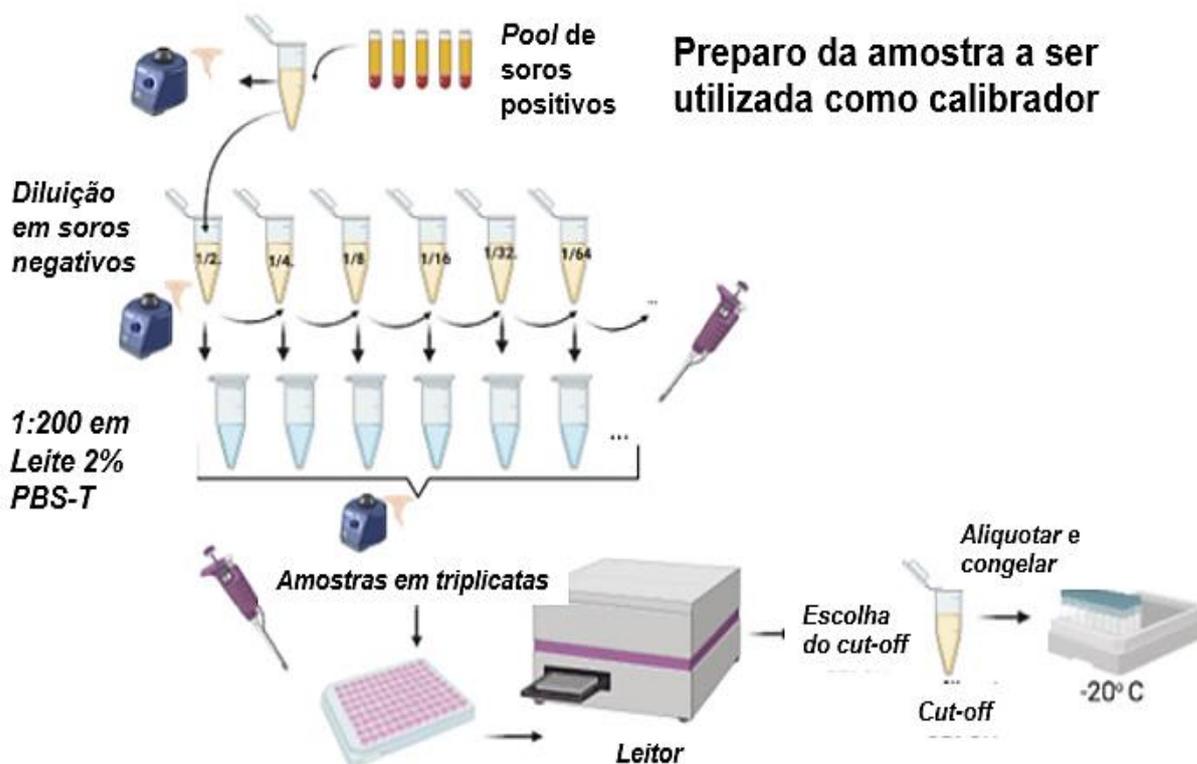
O valor do *cut-off* foi obtido a partir da média das D.Os dos controles saudáveis mais três vezes o desvio padrão, conforme descrito anteriormente (138).

O soro limiar de reatividade (SLR) mencionado acima foi preparado a partir da diluição de um *pool* de soro positivo diluído em soro negativo, e o ponto de diluição ensaiado que correspondeu ao valor da D.O estimada para o *cut-off*, foi armazenado em microtubos com volumes iguais, estocado a -20 °C e descongelado uma vez para o uso em cada reação/placa, conforme exemplificado na Figura 15 (abaixo).

### **Índice de reatividade ELISA IgG rN+RBD**

Os resultados foram expressos em Índice de Reatividade (I.R), calculado pela razão entre a D.O da amostra pela D.O do SLR. Os valores de I.R são considerados positivos se o I.R for  $\geq 1$ .

Figura 15 - Preparo do soro limiar de reatividade do teste ELISA *in-house*



Legenda: As etapas descritas acima abrangem desde a diluição dos soros até o armazenamento das alíquotas a serem utilizadas como SLR.

### 3.10.3 Teste de detecção de anticorpos IgG anti-S1 (S1- ELISA)

O antígeno S1 recombinante para o teste ELISA (IgG-ELISA S1) foi obtido por meio do uso de placas sensibilizadas obtidas comercialmente (EUROIMMUN®, Lubeck, Alemanha).

#### **Cut-off ou limiar de reatividade do ELISA S1**

Um controle de soro calibrador incluso no kit comercial foi usado em cada placa/reacção, que representa o limiar de reatividade do referido teste comercial para distinguir soros negativos, positivos e inconclusivos.

#### **Índice de reatividade ELISA IgG S1**

O valor da D.O do calibrador foi usado como denominador para determinação do I.R, seguindo a fórmula:  $D.O \text{ amostra} / D.O \text{ calibrador}$ . Os resultados foram expressos como índice de reatividade (I.R), calculado pela razão entre a D.O da amostra de soro e do controle calibrador. Os valores de I.R são considerados positivos

se o I.R for  $\geq 1,1$  e o teste foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante. O I.R  $\geq 0,8$  e  $< 1,1$  foi considerado como resultado inconclusivo (“borderline”) conforme as instruções da fabricante.

### **3.11 Teste de Neutralização viral convencional ou biológico (cVNT)**

O teste cVNT foi empregado como o teste padrão-ouro para a detecção de anticorpos totais neutralizantes. O protocolo foi descrito abaixo e previamente publicado (144).

#### **3.11.1 Isolamento viral**

A variante Gama (EPI\_ISL\_1060902), Delta (EPI\_ISL\_2938096) e Ômicron (EPI\_ISL\_6901961, subvariante BA.1) do SARS-CoV-2 foram obtidas por isolamento viral de amostra biológica no laboratório de Virologia segundo a diretrizes de biossegurança padrão. As variantes e foram obtidas por cortesia do laboratório do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, respectivamente e Laboratório de Genética Aplicada a Doenças Infecciosas da Profa. Ester Sabino do IMTSP. Para isolar o vírus SARS-CoV-2 utilizamos a linhagem de células Vero (ATCC® CCL-81™). As células foram adicionadas a um frasco de cultura (poliestireno estéril, frasco apirogênico, 12.5 cm<sup>2</sup>, 25 mL, Jet Biofil®, Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., China) na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL em 3 mL de meio *Dulbecco Minimal Essential Medium* (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife®, Campinas, Brasil) e incubadas por 16hs a 37 °C.

No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e 0.5 ml da amostra viral homogeneizada foi adicionada no frasco com células. Após 1h de incubação (etapa de adsorção) foram acrescentados 3 ml de DMEM contendo 2,5% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-streptomina. Em seguida, introduzimos este frasco em uma incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Foi observada a presença de efeito citopático (CPE) diariamente por 3 a 5 dias. O sobrenadante foi então recolhido e a replicação viral foi confirmada pela visualização do efeito citopático e por RT-PCR.

Para confirmação da variante viral, o sequenciamento do isolado viral foi realizado usando a tecnologia *Nanopore* (Oxford Nanopore Technologies®, Oxonia, Oxford, UK). As bibliotecas foram sequenciadas com o equipamento Oxford Nanopore MinION usando *flow cells* R9.4.1.

### **3.11.2 Titulação do vírus**

Microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços (Jet Biofil®, Jet Bio-Filtration Co., Guangzhou, China) foram preparadas contendo células Vero CCL-81 na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM. Em seguida foi feita uma diluição seriada do vírus em meio de cultura, desde  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ . O meio original das células foi retirado, e esta diluição viral foi adicionada em sextuplicatas. As placas foram então incubadas a 37°C. Foram feitas observações diárias em um período de 72 horas utilizando um microscópio invertido (Nikon Corp. 45178®, Tóquio, Japão). Ao final das observações, as monocamadas de células foram fixadas e coradas com Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich Co.®, Saint Louis, Mississippi, USA) diluído em uma mistura de acetato de sódio-ácido acético. O título viral foi expresso em TCID<sub>50</sub>/mL e calculado utilizando o algoritmo Spearman & Kärber, conforme descrito anteriormente (145).

### **3.11.3 Descrição da técnica cVNT**

O teste cVNT é baseado na avaliação do efeito citopático (CPE) causado pela infecção viral nas células em cultivo (146–148). A técnica utilizou a variante P.1 do vírus SARS-CoV-2 (EPI\_ISL\_1557222 e EPI\_ISL\_804814) em placas de cultura de 96 poços contendo células Vero (linhagem CCL-81, ATCC) na concentração de  $2 \times 10^5$  células por ml. Células foram inicialmente adicionadas para formação da monocamada celular na superfície das placas plásticas (Jet-Biofil®, Guangzhou, China), 24 horas antes da inoculação do vírus. Os soros a serem testados são inativados por 30 min à 56°C. Em seguida, 20 µl de soro do indivíduo foram adicionados a uma nova placa contendo meio de cultura DMEM 1X mais 5% de soro fetal bovino (SFB). Nesta etapa são feitas diluições seriadas em DMEM 1x suplementado de 2% de SFB, com diluições de 1:20 até 1:2.560.

Em seguida, a variante de SARS-CoV-2 a ser estudada foi inoculada nesta mistura de amostra e meio DMEM para então iniciar-se a incubação por 1h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para promover a ligação de anticorpos à superfície viral, caso haja neutralização. A mistura soro e vírus foi transferida para a microplaca inicial com as células Vero, incubada por 72 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as placas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon®, Tóquio, Japão) para verificar a presença ou ausência de efeito citopático. Para confirmar o resultado, as monocamadas celulares foram fixadas e coradas por 30

minutos com o corante *Naphthol Blue Black* (Sigma-Aldrich®, Deisenhofen, Alemanha) diluído em acetato de sódio-ácido acético. Após isto as placas foram lavadas em água destilada.

As diluições de soro em que foi observado o efeito citopático (CPE) foram consideradas como resultado negativo, ou seja, ausência de anticorpos neutralizantes. Por outro lado, nas amostras em que não é observado CPE são consideradas positivas (presença de neutralização viral). A titulação dos anticorpos é calculada de acordo com a maior diluição na qual o efeito citopático foi totalmente inibido. Para cada reação foram incluídos 4 controles: um controle positivo (com anticorpos neutralizantes), um controle negativo (ausência de neutralização), um contendo apenas células sem inoculação do vírus), e um controle de células inoculadas com vírus. O isolamento do vírus e o VNT foram conduzidos em um laboratório de Nível de Biossegurança 3 (NB3).

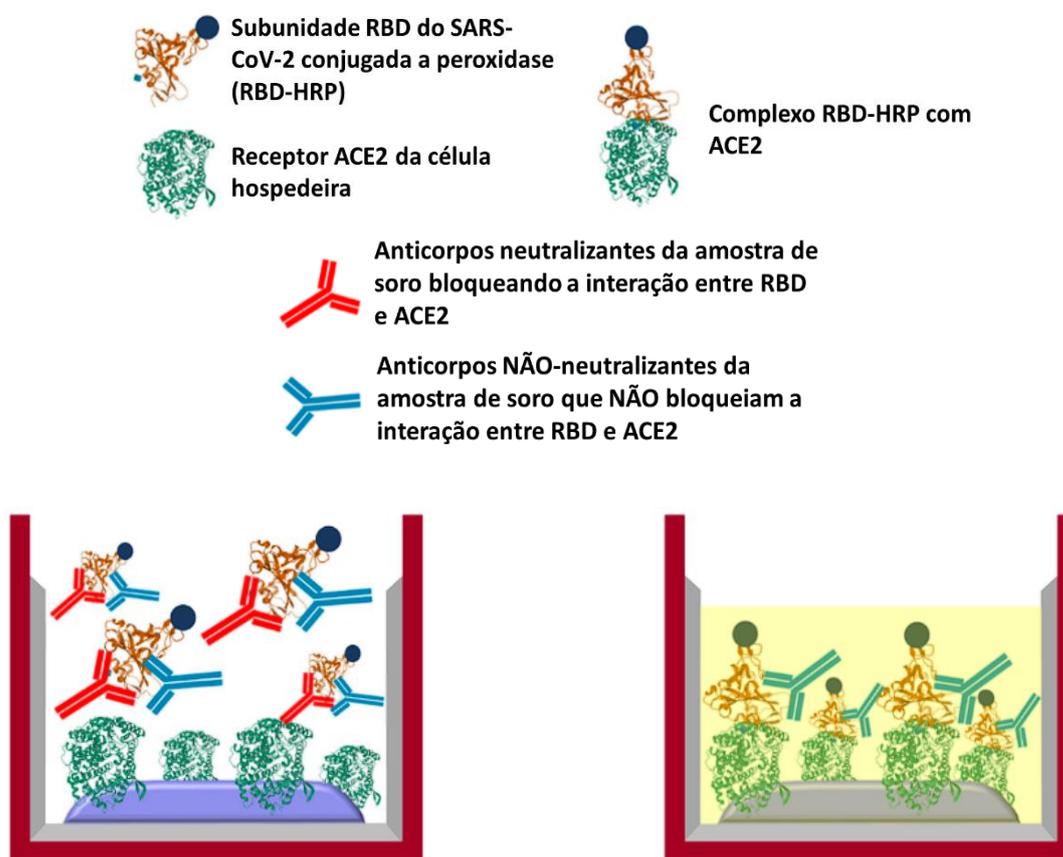
### 3.12 Teste de neutralização sintético (sVNT)

Outra metodologia para detecção de anticorpos neutralizantes foi baseada no teste comercial *cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit* (Genscript®, Nanjing, China), a qual se baseia na formação do complexo proteico RBD-ACE2, e a ligação deste nos anticorpos presentes nas amostras de soro. Caso não haja interação antígeno-anticorpo, ocorre a alteração de cor da reação e a leitura da densidade óptica (D.O) é feita em espectrofotômetro. Após isto, é feito um cálculo da relação D.O da amostra e D.O do controle negativo subtraído de 1:

**Fórmula:  $1 - (\text{D.O amostra} / \text{D.O controle negativo})$**

As amostras com resultados maiores ou iguais a 30% apresentam anticorpos neutralizantes detectáveis. Os experimentos e interpretação dos dados desta etapa foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante (Genscript®, Nanjing, China). Na imagem abaixo (Figura 16) encontra-se o princípio do teste.

Figura 16 - Diagrama explicativo da metodologia comercial *cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (sVNT)*



Fonte: Adaptado das instruções do fabricante (Genscript®, Nanjing, China)

As amostras de soro nas diferentes coletas foram submetidas as análises comparativas entre os testes ELISA IgG (anti-rN+RDB e anti-S1) e VNT (convencional e sintético), conforme tabela abaixo (Tabela 2):

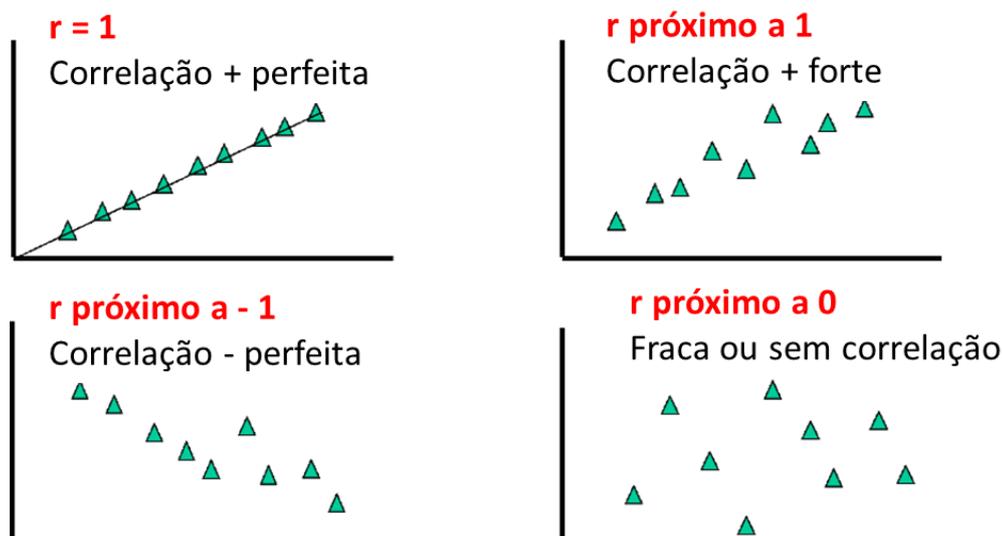
Tabela 2 - Testes sorológicos realizados em cada coleta.

	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
ELISA IgG rN+RDB	x	x	x	x
ELISA IgG S1	x	x	x	x
cVNT (Delta)	x	x		
cVNT (Gama)	x	x		
cVNT (Ômicron)	x	x	x	x
sVNT	x		x	

### 3.13 Análise de correlação entre os testes sorológicos

Nesta etapa foram avaliados os índices de correlação ( $r$ ) entre os testes de detecção de anticorpos adotados neste trabalho nas 4 coletas (rN+RBD, S1, cVNT para as variantes Delta, Gama e Ômicron, e sVNT). A interpretação do coeficiente é feita de acordo com os seguintes parâmetros: **0,1 – 0,39**: correlação **fraca**; **0,4 – 0,69**: correlação **moderada**; **0,7 – 0,89**: correlação **forte**; **0,9 – 1,0**: correlação **muito forte**, como definido previamente (149–151). Quanto mais próximo do 1 estiver o valor de  $r$ , mais forte é a correlação, o que é referido como uma correlação positiva, ou seja, os resultados estão diretamente relacionados. Por outro lado, quanto mais próximo de -1, a correlação é dada como inversa (resultados dos testes são inversamente proporcionais). A imagem abaixo (Figura 17) esquematiza os valores de  $r$  em diferentes cenários de correlação.

Figura 17 - Representação dos valores  $r$  em gráfico de correlação



Fonte: Adaptado de Boston University, 2021 (152)

### 3.14 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas em porcentagem, e as variáveis contínuas em mediana e intervalo interquartil. Os intervalos de confiança de 95% (95% CI) foram avaliados pelo método binomial. Para avaliar a hipótese estatística, nos testes de neutralização, foram adotados os testes Chi-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando for apropriado ( $n \leq 5$ ) em variáveis categóricas, ou o teste de Wilcoxon em variáveis contínuas.

Os métodos de curva ROC e AUC foram os parâmetros usados para avaliar a acurácia em distinguir verdadeiros resultados positivos e negativos dos testes ELISA IgG. O teste de McNemar foi adotado para avaliar amostras pareadas, e para análise de variância nos testes ELISA foi empregado o teste de Friedman. O teste Q de Cochran foi aplicado para avaliar a frequência de positividade nos testes ELISA.

As comparações dos títulos de neutralização entre os grupos etários foram feitas pelo teste de Mann-Whitney e a associação de positividade foi avaliada utilizando o teste exato de Fisher.

As análises de correlação foram estudadas adotando o coeficiente de correlação de Spearman (valor de  $r$ ).

As figuras e gráficos apresentados no trabalho foram preparadas usando os softwares *GraphPad Prism* 5.01, *GraphPad Quickcalcs* (GraphPad Software®, La Jolla, Califórnia, EUA) e *RStudio* (Posit Software®, Boston, MA, EUA).

### 3.15 Considerações éticas

O atual estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número de registro 30419620.1.0000.0068. Os indivíduos elegíveis para o estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) específico, conforme Anexo 8.1.

## 4 RESULTADOS

### ETAPA 1

Os testes para detecção de anticorpos IgG anti-rN+RDB e anti-S1 foram avaliados frente aos soros controles antes de sua aplicação e os resultados estão apresentados abaixo.

#### 4.1 Parâmetros de desempenho do teste ELISA - anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2

##### 4.1.1 Sensibilidade ELISA IgG anti- rN + RBD e anti- S1

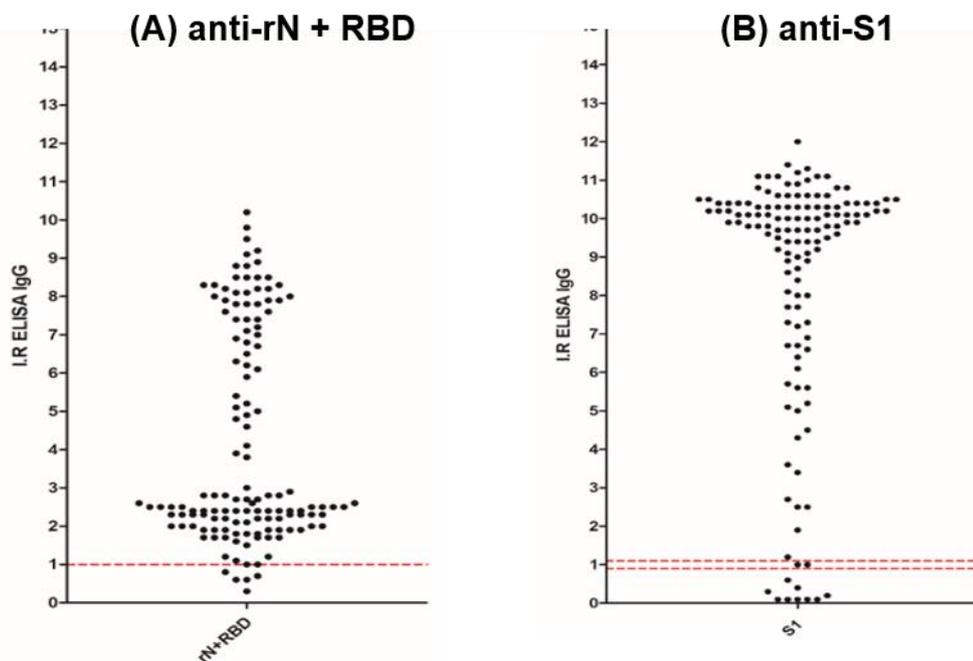
A sensibilidade para a detecção de anticorpos IgG não diferiu estatisticamente entre os testes anti-S1 e anti-RN-RDB ( $p=0,3711$ , teste de McNemar). No entanto, analisando as amostras de soros controles de convalescentes com quadro prévio de COVID-19, obtemos o total de 96,3% (129/134) para anti-S1 e 94,0% (126/134) para anti-rN + RBD, com IC95% (85,79% a 95,83%) para S1 e IC95% (84,49% a 97,12%) para rN+RBD. Dos 134 soros controles, 122 foram concordantes para a soropositividade entre os dois testes, sendo 11 falsos negativos para anticorpos IgG anti-S1 e 8 para anti-rN+RBD. Na Tabela 3 (abaixo) encontra-se a frequência de positividade de forma mais detalhada.

Tabela 3 - Frequência de positividade para os testes sorológicos nos soros controles de indivíduos doentes.

<b>Doentes (n=134)</b>	<b>rN+RBD</b>	<b>S1</b>
Positivos	129 (96,3%)	126 (94%)
Negativos	5 (3,7%)	8 (6%)

Na figura abaixo (Figura 18), é possível observar a distribuição dos índices de reatividade de anticorpos IgG para ambos os alvos e o *cut-off* de cada teste.

Figura 18 - Distribuição do índice de reatividade (I.R) de anticorpos IgG baseado nos respectivos limiares (*cut-off*) para cada teste na avaliação da



Legenda: Em **(A)** para anti-rN + RBD ELISA *in-house*; **(B)** para anti-S1. Soros controles verdadeiramente positivos de indivíduos com histórico de hospitalização com COVID-19 e infecção confirmada por SARS-CoV-2 por RT-PCR, coletados após 20 dias do início dos sintomas para análise da sensibilidade (n=134). Nota: os I.R não foram comparados por se tratar de testes diferentes.

#### 4.1.2 Especificidade dos testes anti- rN + RBD e anti-S1

Não houve diferença estatística entre a especificidade dos dois testes ( $p=0,6831$ , teste de McNemar). Ao analisar as amostras de soros controle do grupo de doadores sadios do período pré-pandemia, obtemos o total de 98,3% (118/120) para o teste de anticorpos anti-S1, e 96,6% (116/120) para o método *in-house* de detecção de anticorpos anti-rN + RBD. Dos 120 soros controles, 114 foram concordantes para a soronegatividade entre os dois testes, sendo 2 deles falsos positivos para anti-rN+RDB e 4 para anti-S1. Nenhum dos soros falso positivos foram

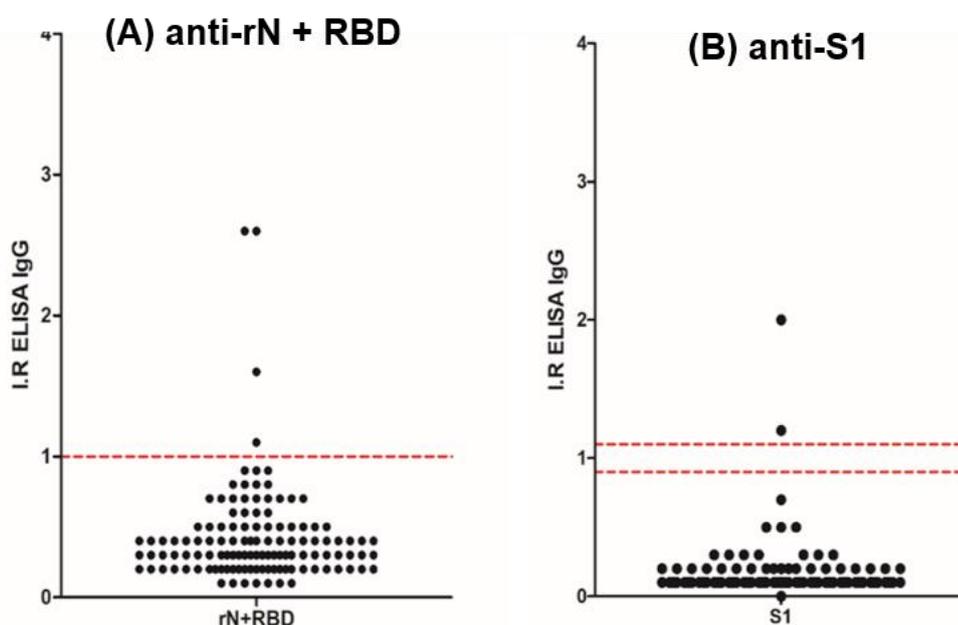
concordantes. Na tabela abaixo (Tabela 4) se encontra a frequência de positividade para os testes ELISA no grupo de soros de indivíduos sadios.

Tabela 4 - Frequência de positividade para os testes sorológicos nos soros de controles de indivíduos sadios

<b>Sadios (n=120)</b>	<b>rN+RBD</b>	<b>S1</b>
Positivo	4 (3,3%)	2 (1,7%)
Negativo	116 (96,7%)	118 (98,3%)

Na figura abaixo (Figura 19), é possível observar a distribuição dos índices de reatividade para ambas as técnicas, de acordo com o seu respectivo *cut-off*.

Figura 19 - Distribuição do índice de reatividade (I.R) de anticorpos IgG, segundo os respectivos limiares dos testes, para avaliação da especificidade

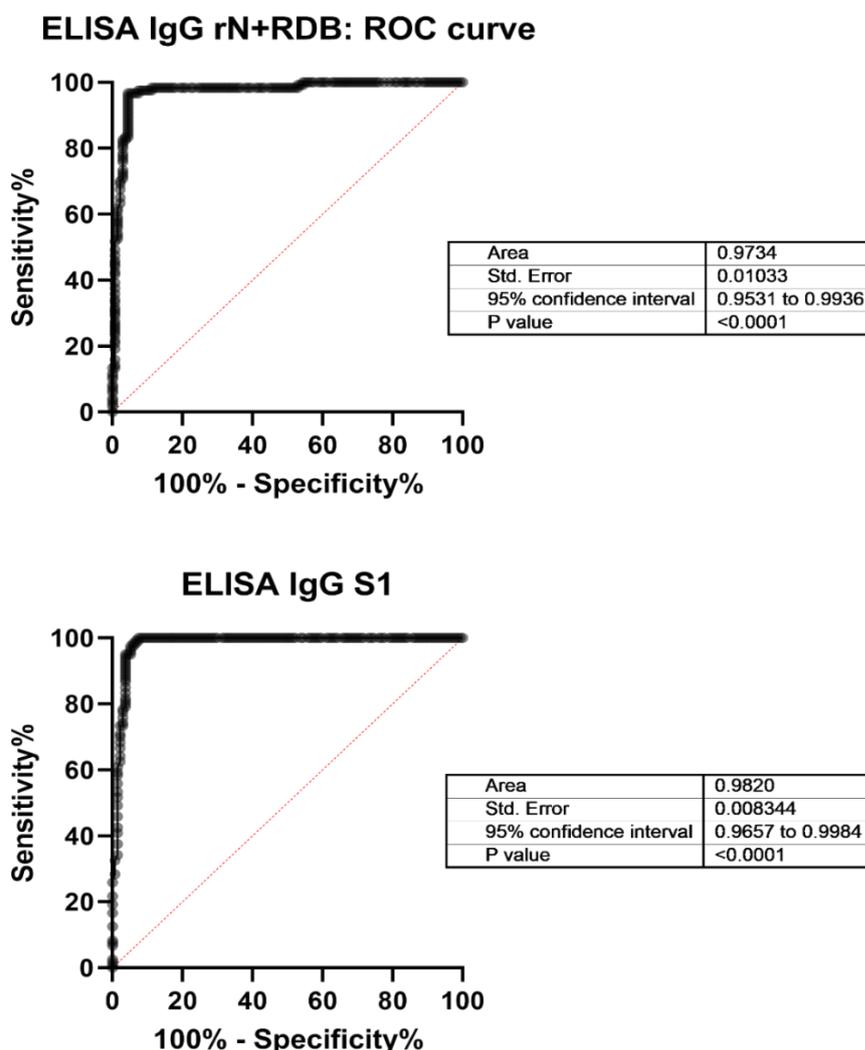


Legenda: **(A)** para anti-rN + RBD; **(B)** para anti-S1. Soros controles verdadeiramente negativos de indivíduos não expostos à infecção por SARS-CoV-2, coletados no período pré-epidemia foram usados nesta análise da especificidade. (n=120).

#### 4.1.3 Análise da acurácia dos testes ELISA IgG pela Curva ROC e AUC

Ambos os testes apresentaram desempenho adequado ( $p < 0.0001$ ), conforme observado pelos valores da AUC da curva ROC próximos de 1: 0,9734 para ELISA IgG anti-rN+RDB e 0,9820 para ELISA IgG anti-S1. A figura abaixo (Figura 20) apresenta a acurácia satisfatória para os ambos os testes baseada na área sob a curva. O valor de AUC da Curva ROC foi dentro dos valores ótimos esperados (AUC  $> 0,9$ ) para ambos os testes.

Figura 20 - Curva ROC dos testes ELISA IgG anti-rN+RDB e anti-S1, respectivamente.



Legenda: AUC  $> 0,9$ ; AUC = área sob a curva

Fonte: Imagem elaborada no software *Graphpad Prism*

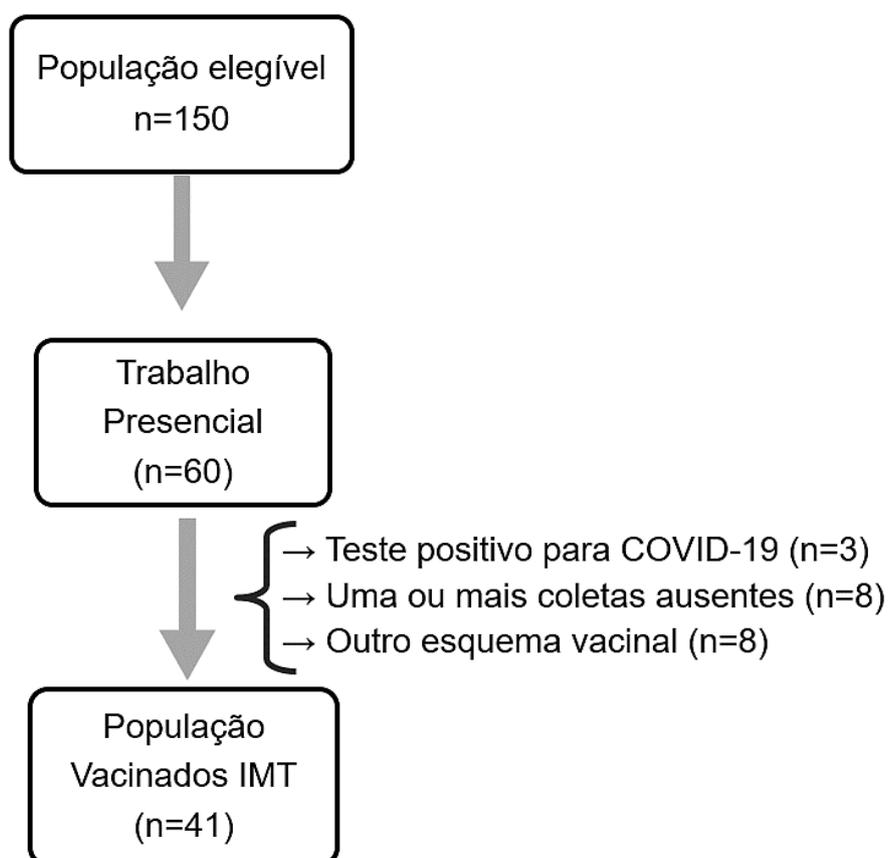
## ETAPA 2

Em seguida, foram apresentados os dados sobre a dinâmica de anticorpos IgG por meio dos testes *in-house* (anti-rN+RDB) e comercial (anti-S1) e anticorpos totais neutralizantes (cVNT e sVNT) na população de indivíduos vacinados.

### 4.2 População elegível

A partir de um levantamento inicial, obtivemos 150 indivíduos elegíveis para o presente estudo. Porém, apenas 60 destes estavam trabalhando de forma presencial no período proposto para as coletas. Além disto, destes 60, o número final de voluntários para o trabalho foi de 41 devido a diversos motivos, como: indivíduos que não estavam presentes em uma ou mais coletas (n=8); teste confirmatório positivo para COVID-19 (n=3); indivíduo que recebeu outro esquema vacinal (se não o previsto neste trabalho, n=8). A imagem abaixo (Figura 21) esquematiza o racional para a população elegível.

Figura 21 - Fluxograma da população elegível para o presente estudo



### 4.3 Caracterização da população de vacinados do estudo

A população de 41 indivíduos vacinados teve a sua média de idade de 53,7 anos, mediana de 55 anos e com idade entre 30 e 77 anos. A maioria (65,9%) teve menos de 60 anos. A maior parte dos voluntários deste grupo era do sexo feminino (90,2%). Ao longo de 1 ano do período do estudo, todos os participantes não apresentaram manifestação clínica de COVID-19 e/ou teste PCR positivo para SARS-CoV-2. Dois indivíduos se tornaram inelegíveis durante o estudo por não estarem disponíveis na ocasião para o esquema de vacinação proposto. Na tabela abaixo (Tabela 5) encontra-se a representação, em porcentagem, da população e seus parâmetros como gênero, idade, etnia, comorbidades e infecção prévia por SARS-CoV-2.

Tabela 5 - Características do grupo de voluntários vacinados incluídos no estudo.

Variáveis	Total (%) n=41
<b>Gênero</b>	
Masculino	4 (9,8%)
Feminino	37 (90,2%)
<b>Idade</b>	
30-40	8 (19,5%)
41-50	9 (21,9%)
51-60	12 (29,3%)
61-77	12 (29,3%)
<b>Etnia<sup>1</sup></b>	
Branca	20 (48,8%)
Negra	3 (7,3%)
Parda	7 (17,1%)
Amarela	2 (4,9%)
Não informado	9 (21,9%)
<b>Comorbidades<sup>2</sup></b>	
Sim	10 (24,4%)
Não	30 (73,2%)
Não informado	1 (2,4%)

<sup>1</sup> Informação autodeclarada;

<sup>2</sup> Doença pulmonar crônica, diabetes, doença cardiovascular, obesidade, hipertensão, câncer (prévio ao estudo) e outros como doenças respiratórias;

#### 4.4 Teste ELISA: perfil de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

##### 4.4.1 Dinâmica e extensão da resposta de anticorpos IgG ao longo do esquema vacinal

Em relação a frequência de soropositivos para **anticorpos IgG anti-rN+RDB**: na coleta 1 foi de 60,9%; na coleta 2 cerca de 6 meses após as duas doses por CoronaVac®, a porcentagem foi de 24,4% de positivos ( $p=0,007$ , teste Q de Cochran); na coleta 3, cerca de 60 dias após a dose de reforço pelo imunizante da Pfizer®, a taxa de IgG-positivos foi 97,4% de positivos ( $p<0,001$ , teste Q de Cochran); na última coleta deste grupo, um total de 94,7% foi observado positivos (não significativo, teste Q de Cochran).

Foram observados os seguintes resultados na frequência de positivos para **anticorpos IgG anti-S1**: na coleta 1 um total de 100%; na coleta 2 no mesmo grupo ocorreu uma frequência dos positivos de 60,9% (não significativo, teste Q de Cochran); na coleta 3, após o *booster* (3ª dose vacinal), a taxa de positivos foi para 100% (não significativo, teste Q de Cochran); na última coleta deste grupo, a porcentagem se manteve, com o total de 100% de indivíduos com anticorpos IgG detectados (não significativo, teste Q de Cochran).

Na comparação entre os dois testes ELISA, a frequência de soropositividade foi significativamente diferente entre anti-rN+RDB e S1 na primeira coleta após a vacina ( $p= 0,0002$ , teste de McNemar). Na coleta seguinte (coleta 2) esta diferença também se mostra significativa ( $p= 0,0023$ , teste de McNemar). Ainda, nas coletas posteriores, a diferença na frequência de soropositividade entre ambos os testes não diferiu significativamente (conforme Tabela 6 abaixo). A combinação dos resultados dos testes anti-rN+RDB e anti-S1 aumentou a frequência de detecção de anticorpos IgG na segunda coleta, 186 dias após a segunda dose da CoronaVac.

Tabela 6 - Distribuição do número e frequência de soropositivos para anticorpos IgG anti-rN+RDB, anti-S1 e ambos anti- rN+RDB e/ou anti-S1.

Esquema	Tempo	Coleta	rN+RBD %	S1 %	Ambos %	Valor p
CoronaVac	D32	Coleta 1 (n=41)	25 (60,9%)	41 (100%)	41 (100%)	0,0002
CoronaVac	D186	Coleta 2 (n=41)	10 (24,4%)	25 (60,9%)	27 (65,8%)	0,0023
Pfizer	D62	Coleta 3 (n=39)	38 (97,4%)	39 (100%)	39 (100%)	ns
Pfizer	D151	Coleta 4 (n=38)	36 (94,7%)	38 (100%)	38 (100%)	ns

Legenda: ns = não significativo, teste de McNemar. Esquema vacinal CoronaVac e reforço com Pfizer; D32= 32 dias (mediana) após 2ª dose Coronavac; D186 = 186 dias (mediana) após 2ª dose por CoronaVac; D62 = 62 dias (mediana) após dose de reforço (Pfizer); D151 = 151 dias (mediana) após dose de reforço. Nota: combinação dos resultados de ambos os testes = S1 e/ou rN+RDB

#### 4.4.2 Índice de reatividade (I.R) - Anti-rN + RBD

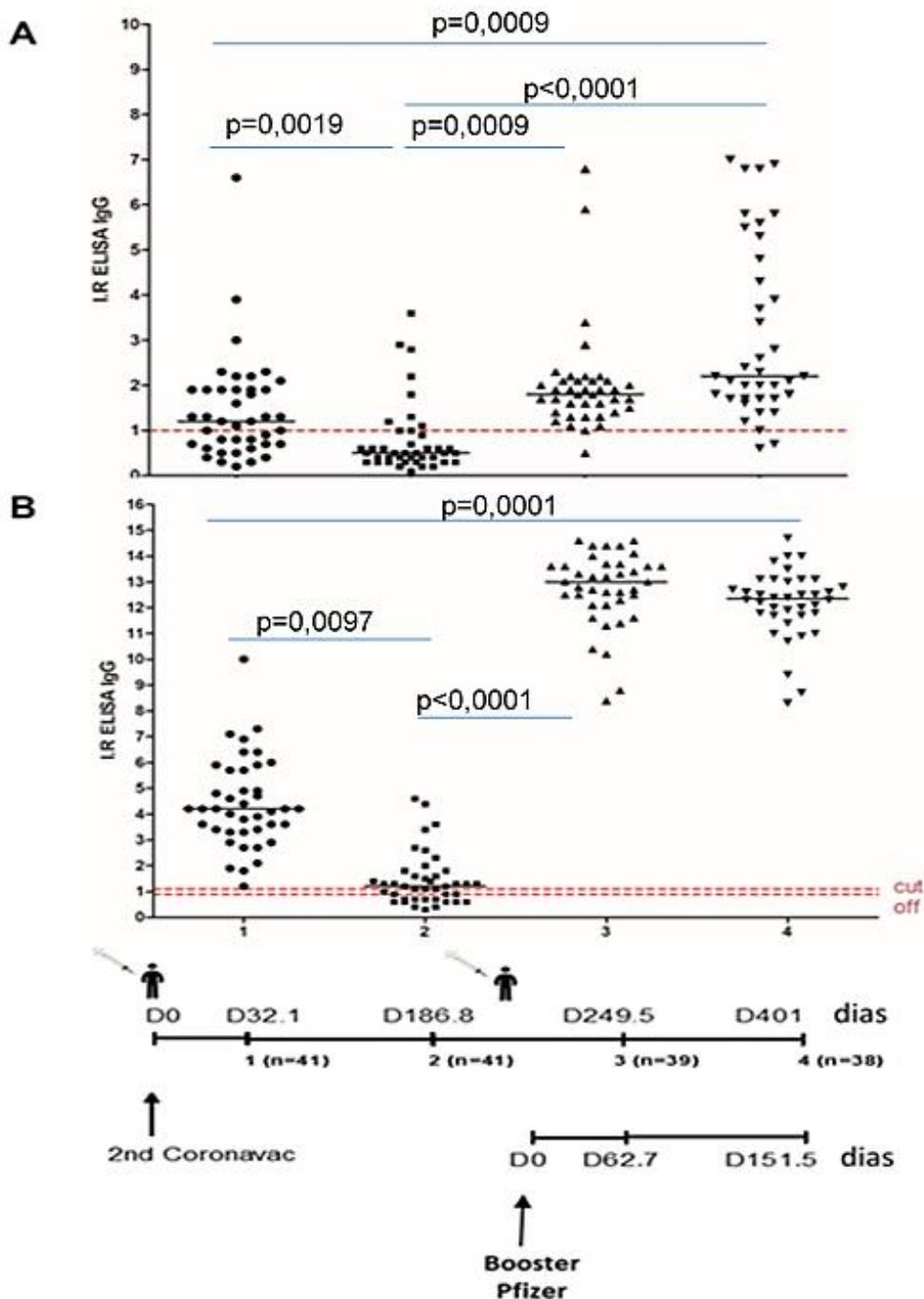
O índice de reatividade (I.R) dado pelo teste ELISA IgG rN+RDB ao longo do esquema vacinal significativamente diferiu entre a coleta 1 e coleta 2 ( $p=0,0019$ , teste de Friedman), coletas 2 e 3 ( $p=0,0009$ , teste de Friedman) e entre a coleta 1 e a coleta 4 ( $p=0,0009$ , teste de Friedman), e entre as coletas 2 e 4 ( $p<0,0001$ , teste de Friedman). Na figura 17 (A) encontram-se distribuídos os valores dos índices de reatividade de anticorpos IgG anti-rN+RDB ao longo do tempo.

#### 4.4.3 Índice de reatividade (I.R) - Anti-S1

O índice de reatividade (I.R) dado pelo teste ELISA IgG anti-S1 ao longo do esquema vacinal significativamente diferiu entre a coleta 1 e coleta 2 ( $p=0,0097$ , teste de Friedman), coletas 2 e 3 ( $p<0,0001$ , teste de Friedman) e entre a coleta 1 e coleta 4 ( $p=0,0001$ , teste de Friedman). Na Figura 19 (abaixo) encontram-se distribuídos os valores dos índices de reatividade de anticorpos anti-S1 ao longo do tempo.

A Figura 22 (na página abaixo) descreve a distribuição do índice de reatividade de anticorpos IgG anti-rN+RDB e anti-S1 entre as 4 coletas de soro durante o esquema vacinal para COVID-19.

Figura 22 - Distribuição do índice de reatividade para anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 (ELISA) nos 4 diferentes tempos.



Legenda: Da esquerda para direita: coleta 1 (n=41); coleta 2 (n=41); coleta 3 (n=39); coleta 4 (n=38), para a mediana do número de dias: 32 dias, 186 dias, 62 dias pós-reforço e 151 dias pós-reforço, respectivamente. **(A)** ELISA IgG anti-rN+RDB – coleta 1 e 2 ( $p=0,0019$ ), coleta 2 e 3 ( $p=0,0009$ ), coleta 2 e 4 ( $p=0,0001$ ) e coleta 1 e 4,  $p=0,0009$ , teste de Friedman); **(B)** ELISA IgG anti-S1 - coleta 1 e 2 ( $p=0,0097$ ), coleta 2 e 3 ( $p<0,0001$ ), coleta 1 e 4 ( $p=0,0001$ ), teste de Friedman.

#### **4.5 Teste cVNT: dinâmica da frequência e título de anticorpos neutralizantes frente às VOCs ao longo do esquema vacinal**

O número de soros com atividade de neutralização viral (cVNT) contra as variantes do SARS-CoV-2 nas diferentes coletas é mostrado na Tabela 7 (abaixo). Aos 32 dias após a vacinação, um total de 78,0% dos soros neutralizou a variante Gama, 65,9% neutralizou a variante Delta e 58,5% neutralizou a variante Ômicron. Essas diferenças não foram significativas.

Além disto, aos 186 dias (coleta 2) após a vacinação, 17,1%, 24,4% e 2,4% dos soros neutralizaram as variantes Gama, Delta e Ômicron, respectivamente. A diferença no número de soros positivos para atividade neutralizante contra as variantes Gama e Ômicron foi significativa ( $p = 0,007$ , teste exato de Fisher). O título de anticorpos foi maior para todas as três variantes em 32 dias (coleta 1) do que em 186 dias pós-vacinação (coleta 2) ( $p < 0,001$ , teste de Wilcoxon) e foi o maior na primeira coleta para a variante Gama.

No tempo de 60 dias (coleta 3) após a vacinação pelo imunizante da Pfizer®, os anticorpos neutralizantes estavam presentes em 87,2%. No tempo de 151,5 dias (coleta 4), a frequência de positividade para anticorpos neutralizantes contra a variante Ômicron alcançou 60,5%.

Tabela 7 - Total e título de anticorpos neutralizantes contra as variantes de SARS-CoV-2 em soros de indivíduos após vacinação com a vacina CoronaVac® e reforço com a vacina Pfizer®.

<b>Dias (coletas)</b>	<b>Variantes virais</b>	<b>cVNT positivo n, (%)</b>	<b>Mediana do Título VNT (mínimo, máximo)</b>
D32 (Coleta 1)	Gama	32 (78%)	1:40 (0, 1:1280)
	Delta	27 (65,9%)	1:20 (0, 1:80)
	Ômicron	24 (58,5%)	1:20 (0, 1:40)
D186 (Coleta 2)	Gama	10 (17,1%)*	0 (0, 1:80)
	Delta	7 (24,4%)	0 (0, 1:80)
	Ômicron	1 (2,4%)*	0 (0, 1:20)
D62 (Coleta 3)	Ômicron	34 (87,2%)	1:40 (0, 1:160)
D151 (Coleta 4)	Ômicron	23 (60,5%)	1: 20 (0, 1: 160)

Legenda: n= Número de casos; % frequência; coleta 1:32 dias após a 2ª dose da Coronovac; coleta 2: 186 dias após a 2ª dose da Coronovac; coleta 3: 62 dias após o reforço por Pfizer; coleta 4: 151 dias após o reforço por Pfizer. A diferença entre a frequência de positivos para anticorpos neutralizantes foi significativa entre Ômicron e Gama ( $p= 0,007$  (teste exato de Fisher).

Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.* (144,153), publicações referentes a esta dissertação.

As tabelas abaixo apresentam os títulos (Tabela 8) e frequência de positividade dos anticorpos neutralizantes (Tabela 9) ao longo do tempo distribuídos entre os vacinados em função da faixa etária (< 60 anos vs.  $\geq 60$  anos) O total de soros com atividade neutralizante (Tabela 9,  $p = 0,004$ , teste exato de Fisher) assim como os títulos dos mesmos (Tabela 8,  $p = 0,003$ , teste de Mann-Whitney) foram significativamente maiores para a variante Gama na faixa etária menor que 60 anos em comparação com a faixa etária maior que 60 anos.

Tabela 8 – Comparação de dois grupos etários com os títulos de anticorpos neutralizantes para as VOCs de SARS-CoV-2 em quatro diferentes coletas de soro dos indivíduos vacinados com o imunizante CoronaVac® seguido de dose reforço pela vacina Pfizer®.

Dias (coletas)	Variante cVNT	Idade < 60 anos (n=27)	Idade ≥ 60 anos (n=14)	Valor-p
D32 (Coleta 1)	Gama	1:40 (0, 1:1280)	1:10 (0, 1:80)	0,003*
	Delta	1:20 (0, 1:80)	1:20 (0, 1:40)	0,246
	Ômicron	1:20 (0, 1:40)	1:10 (0, 1:40)	0,269
D186 (Coleta 2)	Gama	0 (0, 1:80)	0 (0, 1:20)	0,391
	Delta	0 (0, 1:80)	0 (0, 0)	0,185
	Ômicron	0 (0, 1:20)	0 (0, 0)	0,860
D62 (Coleta 3)	Ômicron	1:40 (0, 1:320)	1:40 (0, 1:80)	0,398
D151 (Coleta 4)	Ômicron	1:20 (0, 1:160)	1:20 (0, 1:80)	0,460

Legenda: coleta 1: 32 dias após a 2ª dose da Coronovac; coleta 2: 186 dias após a 2ª dose da Coronovac; coleta 3: 62 dias após o reforço por Pfizer; coleta 4: 151 dias após o reforço por Pfizer. Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.* (144);\* p= 0,003; Mann-Whitney.

Tabela 9 - Comparação de dois grupos etários com a frequência de positividade para anticorpos neutralizantes para as variantes do SARS-CoV-2 em quatro diferentes coletas em indivíduos vacinados com o imunizante CoronaVac® seguido de dose adicional pela vacina Pfizer®.

Dias (coletas)	Variante cVNT	Idade < 60 anos (n=27)	Idade ≥ 60 anos (n=14)	Valor-p
D32 (Coleta 1)	Gama	25 (92,6%)	7 (50,0%)	0,004*
	Delta	19 (70,4%)	8 (57,0%)	0,494
	Ômicron	17 (63%)	7 (50,0%)	0,512
D186 (Coleta 2)	Gama	8 (29,6%)	2 (14,3%)	0,447
	Delta	7 (25,9%)	0 (0)	0,075
	Ômicron	1 (3,7%)	0 (0)	> 0,999
D62 (Coleta 3)	Ômicron	23 (88,5%)	9 (84,6%)	> 0,999
D152 (Coleta 4)	Ômicron	15 (60%)	8 (61,5%)	> 0,999

Legenda: \*p=0,004; teste de Fisher. Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.* (144), publicação referente a esta dissertação.

#### 4.6 Comparação da frequência de positividade de anticorpos neutralizantes entre sVNT e cVNT para as VOCs na análise dos soros dos vacinados

Na Tabela abaixo (Tabela 10) está descrita a diferença significativa entre as frequências de positividade para anticorpos neutralizantes entre os testes sVNT (sintético) e o convencional (cVNT) para variantes Delta e Ômicron. Na Coleta 1 (realizada 32 dias após a 2ª dose por CoronaVac), o total de indivíduos com anticorpos foi de 90,2% no teste sintético (sVNT), e pelo método convencional (cVNT) foi observado um total de 78% de atividade neutralizante para a variante Gama ( $p=0,4795$ , teste de McNemar); 65,9% para a Delta ( $p=0,0094$ , teste de McNemar); 58,5% para a variante Ômicron ( $p=0,0019$ , teste de McNemar). Após o reforço vacinal, na coleta 3, um total de 97,4% dos soros teve capacidade neutralizante para o método sintético, enquanto que para a variante Ômicron, pela técnica convencional, foi observado um total de 87,2% ( $p=0,2207$ , teste de McNemar).

Tabela 10 - Frequência de positividade para anticorpos neutralizantes frente às técnicas cVNT com as VOCs circulantes na ocasião e sVNT nos vacinados

Coletas	sVNT (cPass)	cVNT Gama	cVNT Delta	cVNT Ômicron
Coleta 1 (n=41)	37 (90,2%)	32 (78%)	27 (65,9%) <sup>a</sup>	24 (58,5%) <sup>b</sup>
Coleta 3 (n=39)	38 (97,4%)	N/A	N/A	29 (87,2%)

Legenda: Coleta 1: sVNT vs. cVNT Gama: ns; sVNT vs. cVNT Delta: <sup>a</sup> $p=0,0094^*$ ; sVNT vs. cVNT Ômicron: <sup>b</sup> $p=0,0019^*$ . Coleta 3: sVNT vs. cVNT Ômicron: ns; N/A = amostra não selecionada para análise; ns = diferença não significativa. \*Teste de McNemar.

#### 4.7 Comparação das frequências de positividade entre os testes sorológicos ELISA IgG (anti-rN+RDB e anti-S1), cVNT e sVNT (Gama, Delta e Ômicron) na análise dos soros dos vacinados

As frequências de positividade que apresentaram a diferença significativa na coleta 1 foram rN+RBD vs. S1, rN+RBD vs. sVNT, S1 vs. Gama, S1 vs. Delta, S1 vs. Ômicron, Delta vs. sVNT (teste de McNemar,  $p < 0,05$ ). As frequências de positividade da coleta 3 não apresentaram diferença significativa entre os testes. A Tabela 11 (abaixo) apresenta as comparações da frequência de positividade de todos os testes entre as 4 coletas incluindo o teste sVNT. Os valores-p exatos para cada comparação estão listados no Anexo 8.3.

Tabela 11 - Frequência de positividade entre os testes sorológicos e coletas nos vacinados

<b>Coletas</b>	<b>sVNT (cPass)</b>	<b>rN+RBD</b>	<b>S1</b>	<b>cVNT Gama</b>	<b>cVNT Delta</b>	<b>cVNT Ômicron</b>
Coleta 1 (n=41)	90,2%	60,9%	100%	75,6%	65,8%	58,5%
Coleta 3 (n=39)	97,4%	97,4%	100%	N/A	N/A	87,2%

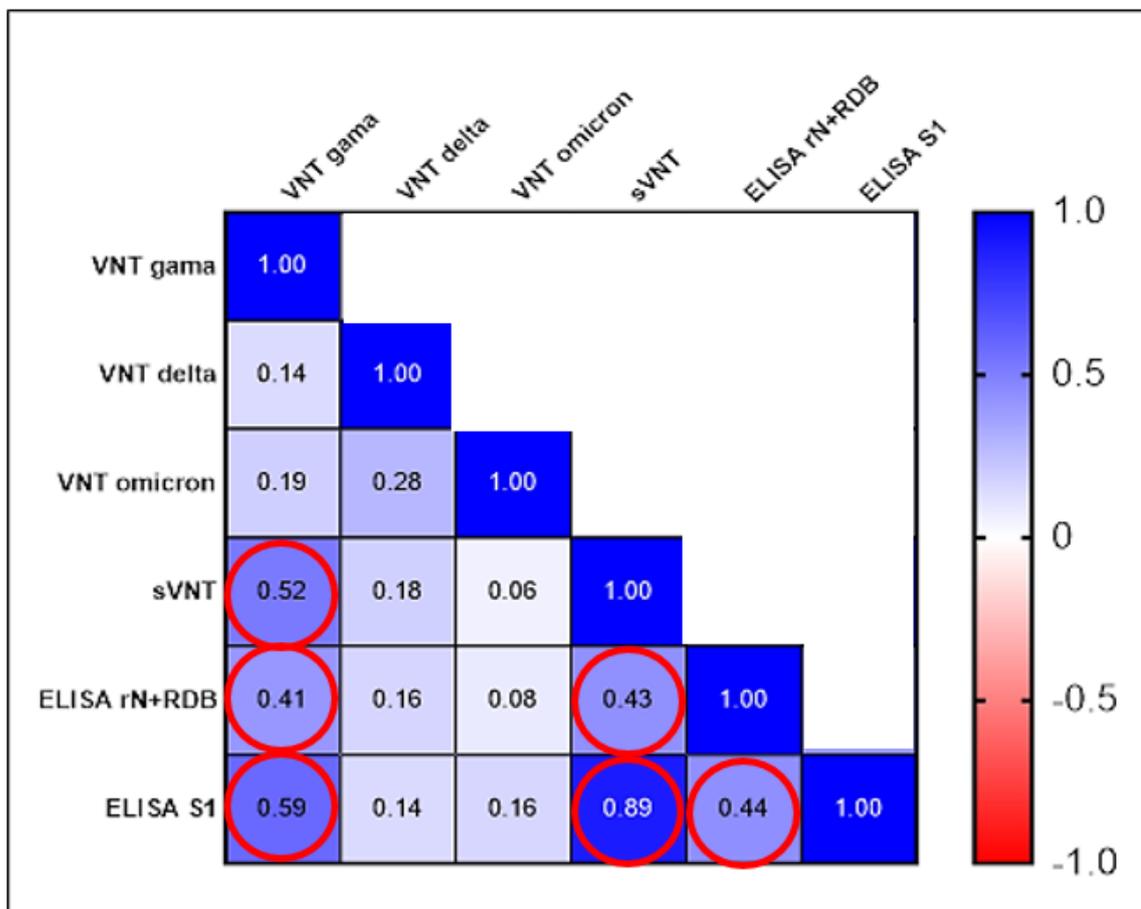
#### 4.8 Análise da correlação entre os testes sorológicos em relação ao teste padrão-ouro avaliada ao longo do esquema vacinal

A análise de correlação foi feita entre os testes sorológicos (ELISA rN+RBD; ELISA S1; VNT Gama; VNT Delta; VNT Ômicron; sVNT) entre as 4 coletas de soro. A correlação foi positiva moderada entre os testes ELISAs, cVNT baseado na variante **Gama** e a correlação **foi forte e positiva entre ELISA S1 vs. sVNT**, após a **segunda dose da CoronaVac®**. Nas demais coletas, após 6 meses da segunda dose e incluindo o reforço vacinal, as correlações moderadas positivas ocorreram significativamente apenas entre os testes ELISA para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2. As Figuras 22 a 25 detalham os índices de correlação ( $r$ ) expressos em *Heat Map* entre os testes em cada coleta.

#### 4.8.1 Coleta 1

Na primeira coleta do estudo, 30 dias após a segunda dose vacinal, as houve correlação positiva e moderada entre ELISA rN + RBD vs. ELISA S1 ( $r=0,44$ ;  $IC=0,14 - 0,66$ ;  $p=0,004$ ); ELISA rN + RBD vs. VNT Gama ( $r=0,41$ ;  $IC= 0,11 - 0,64$ ;  $p=0,008$ ); ELISA rN + RBD vs. sVNT ( $r=0,43$ ;  $IC=0,14 - 0,66$ ;  $p=0,005$ ); ELISA S1 vs. VNT Gama ( $r=0,59$ ;  $IC=0,33 - 0,76$ ;  $p<0,0001$ ); ELISA S1 vs. sVNT ( $r=0,89$ ;  $IC=0,80 - 0,94$ ;  $p<0,0001$ ); VNT Gama vs. sVNT ( $r=0,52$ ;  $IC=0,24 - 0,72$ ;  $p=0,005$ ). As demais correlações não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A Figura 23 (abaixo) representa os índices de correlação entre os testes por Heat Map na coleta 1.

Figura 23 - *Heat map* para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 1.

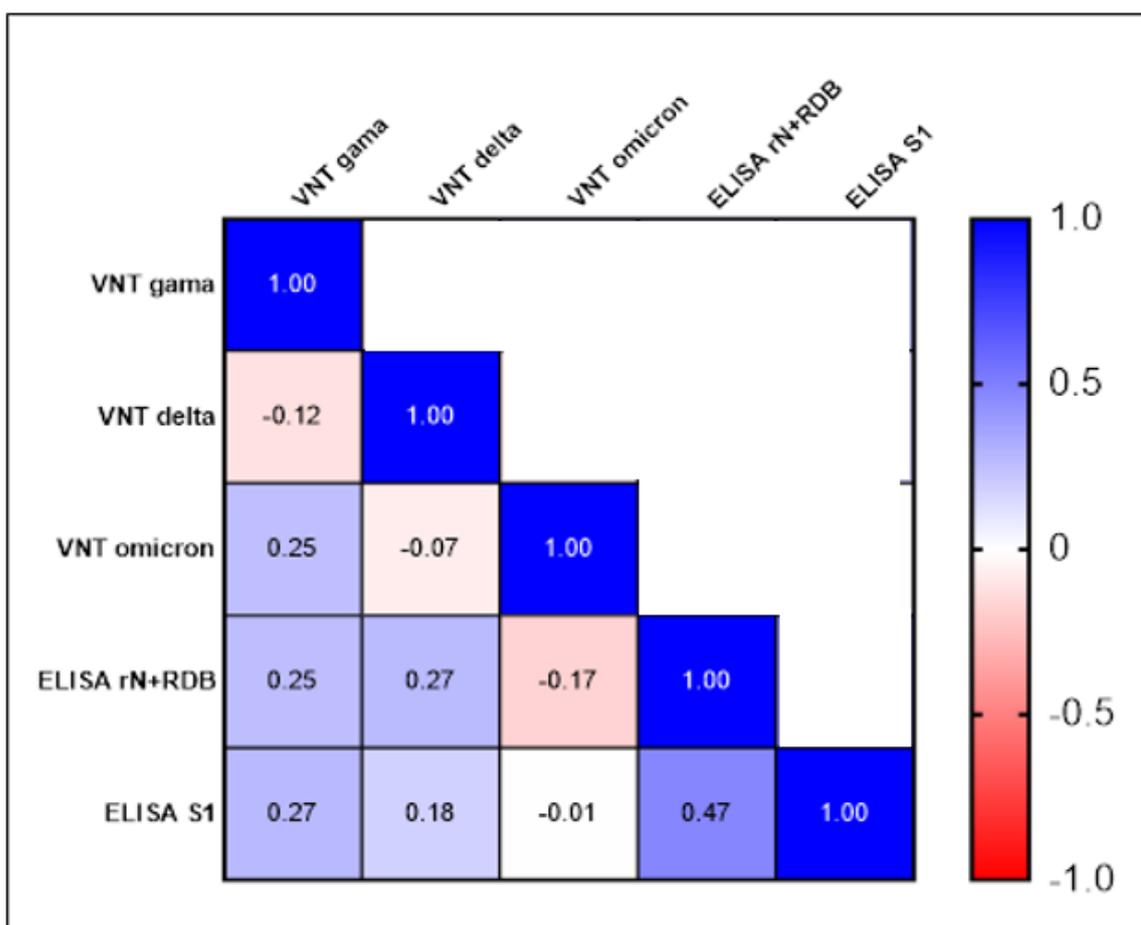


Legenda: Os valores estão representados em índices de correlação (valor de r) pelo teste de Spearman. Os tons de azul a branco indicam a força da correlação. Os círculos em vermelhos indicaram as correlações estatisticamente significativas: rN+RBD vs. S1:  $p=0,004$ ; rN+RBD vs. Gama:  $p=0,008$ ; rN+RBD vs. sVNT:  $p=0,005$ ; S1 vs. Gama:  $p<0,001$ ; S1 vs. sVNT:  $p<0,001$ ; Gama vs. sVNT:  $p=0,005$ .

#### 4.8.2 Coleta 2

Na coleta seguinte, cerca de 6 meses após a segunda dose de CoronaVac®, a correlação entre o teste ELISA rN + RDB e o teste ELISA S1 foi significativamente positiva ( $r=0,47$ ;  $IC=0,18 - 0,69$ ;  $p=0,002$ ). Não houve correlação entre os demais testes. A Figura 24 (abaixo) representa os índices de correlação ( $r$ ) em *Heat map* na coleta 2.

Figura 24 - *Heat map* para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 2.

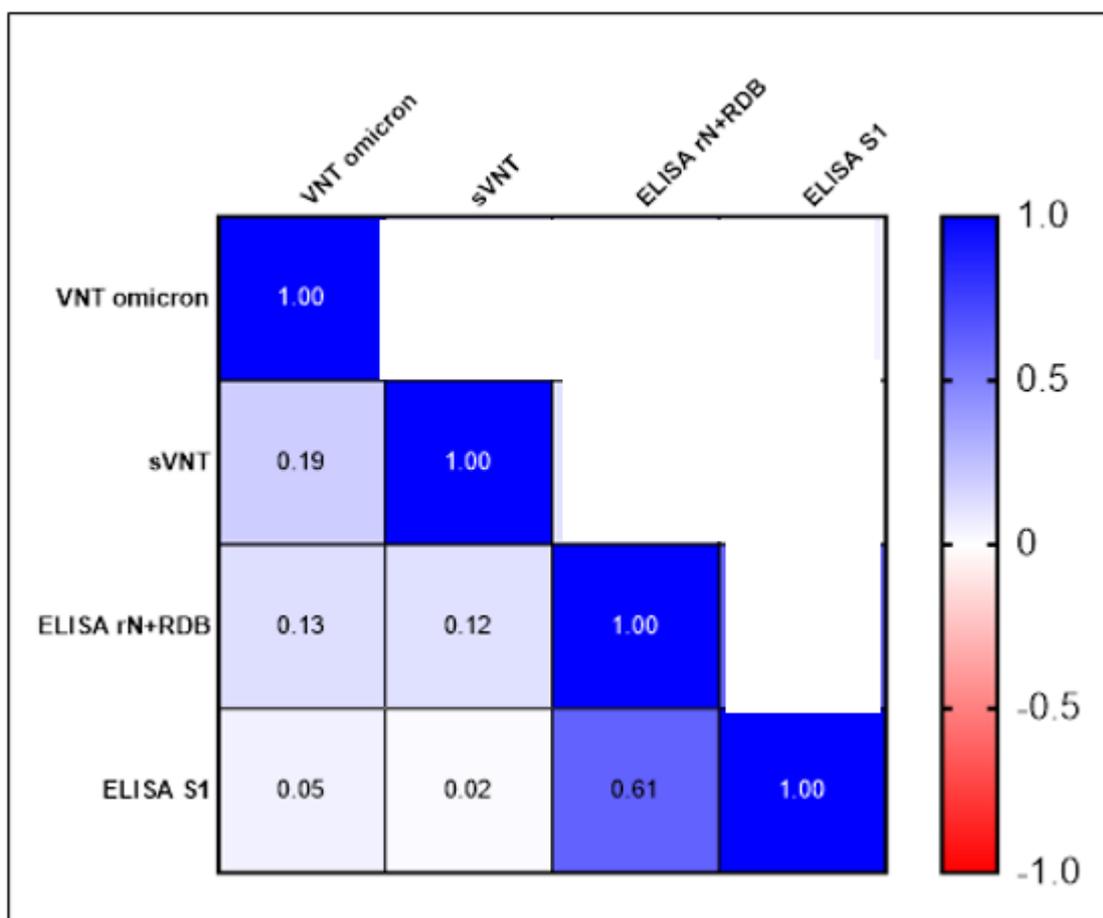


Legenda: Os valores estão representados em índices de correlação (valor de  $r$ ) pelo teste de Spearman. Os tons de azul a branco indicam a força da correlação. Foi significativa a correlação com  $p < 0,05$ .

### 4.8.3 Coleta 3

Na terceira coleta, 60 dias após a dose de reforço por Pfizer®, apenas houve correlação entre os testes ELISA rN + RDB e o teste ELISA S1 apresentou correlação positiva ( $r=0,61$ ; IC= 0,36 – 0,78;  $p<0,0001$ ). Os demais testes não apresentaram correlação significativa. A Figura 25 (abaixo) representa os índices de correlação ( $r$ ) em *Heat map* na coleta 3.

Figura 25 - *Heat map* para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 3.

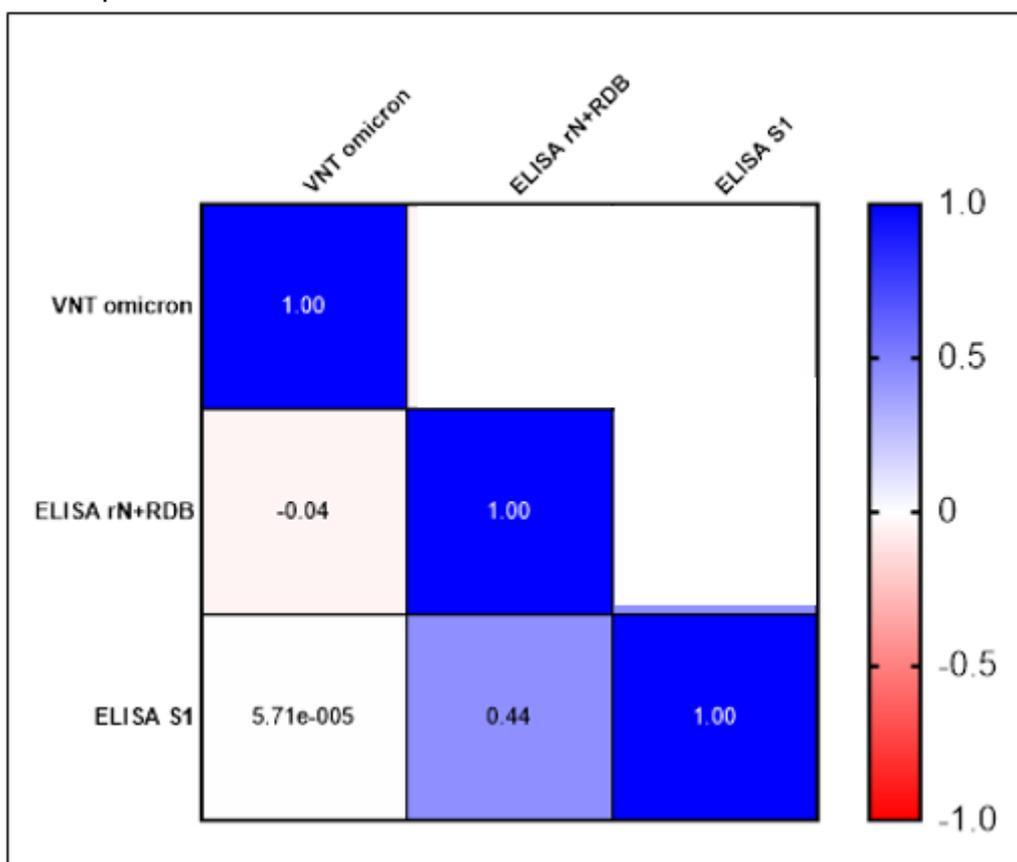


Legenda: Os valores estão representados em índices de correlação (valor de  $r$ ) pelo teste de Spearman. Os tons de azul a branco indicam a força da correlação. Foi significativa a correlação com  $p < 0,05$ .

#### 4.8.4 Coleta 4

Na última coleta deste estudo, cerca de 150 dias após a dose vacinal de reforço, a correlação positiva foi mantida significativa entre os testes ELISA rN + RDB e ELISA S1 ( $r=0,44$ ; IC=0,13 – 0,67;  $p=0,006$ ). Não houve correlação significativa entre os outros testes. A Figura 26 (abaixo) representa os índices de correlação ( $r$ ) em *Heat map* na coleta 4.

Figura 26 - Heat map para correlação entre os métodos de detecção de anticorpos na coleta 4.



Legenda: Os valores estão representados em índices de correlação (valor de  $r$ ) pelo teste de Spearman. Os tons de azul a branco indicam a força da correlação. Foi significativa a correlação com  $p < 0,05$ .

## 4.9 Análise descritiva dos títulos de anticorpos totais neutralizantes por cVNT Ômicron e os resultados dos testes ELISA e sVNT na análise dos soros dos vacinados

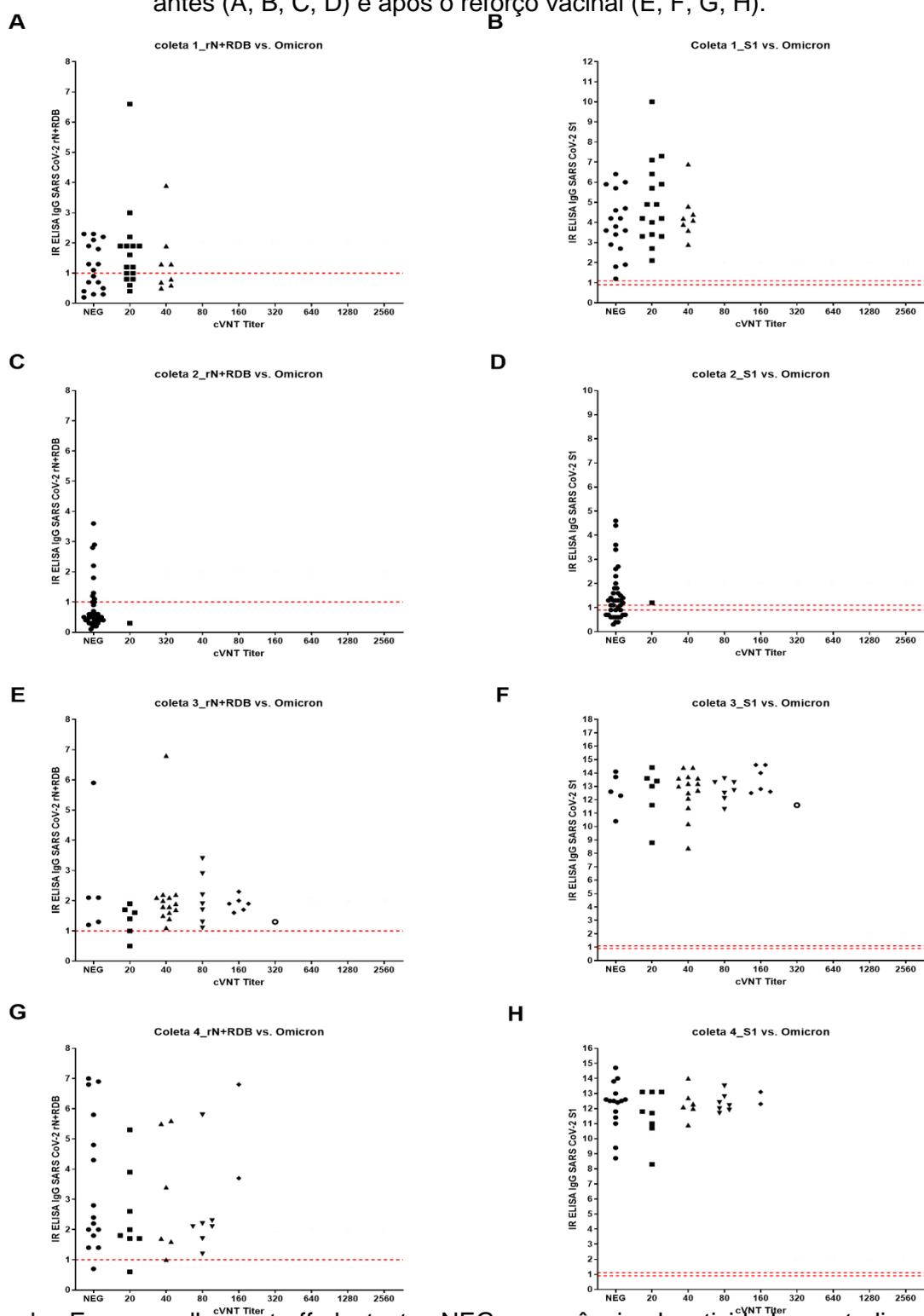
### 4.9.1 cVNT e ELISA

A Figura 27 (abaixo) apresenta a distribuição dos índices de reatividade dos anticorpos para o teste ELISA rN + RBD e S1 e porcentagem de inibição para sVNT de acordo com os seus correspondentes títulos de anticorpos neutralizantes para a variante Ômicron (cVNT) durante o esquema vacinal. A positividade de anticorpos IgG anti-S1 e anti-rN+RDB foi mais alta na coleta 3 (61 dias após a o reforço vacinal) na presença de anticorpos neutralizantes em quase 87,2% dos casos (34/39) e títulos de anticorpos neutralizantes alcançando até 1/320. Teste ELISA IgG anti-rN+RDB negativo apresentou cVNT positivo com títulos de anticorpos neutralizantes de 1/20 a 1/40 na coleta 1, 32 dias após dose de CoronaVac. Após o reforço com Pfizer, a positividade para ELISA IgG foi elevada em todos os testes sorológicos, no entanto a discordância (cVNT negativo e anti-S1 e anti-rN+RDB positivos) foi de 39,4% em 151 dias após a vacina Pfizer.

Em relação ao cVNT negativo, dezessete casos apresentaram os títulos menores do que 1/20 (cVNT negativo) no teste padrão ouro de cVNT Ômicron após a segunda dose da CoronaVac (coleta 1, 32 dias após a vacina). Um total de 100% (17/17) desses soros apresentaram anticorpos IgG anti-S1 com índice de reatividade variando de 1,9 a 4,6 e anti-rN+RDB variando de 1,1 a 2,3 em 52,9% casos (9/17). Após 186 dias da segunda dose da CoronaVac, o título máximo de anticorpos neutralizantes foi 1/20 por cVNT. Os títulos de anticorpos totais neutralizantes foram menores que 1/20 na quase totalidade dos soros (40 soros com testes cVNT negativo). Destes, um total de 60% (24/40) apresentaram anticorpos IgG anti-S1 com índice de reatividade variando de 1,1 a 4,6 enquanto 25% (10/40) destes soros apresentaram anticorpos IgG anti-rN+RDB com índice variando entre 1,0 a 3,6. Após a dose de reforço, o título de anticorpos neutralizantes se estendeu até 1/320. Dos cinco soros com testes cVNT negativos na coleta 3 (61 dias após o reforço), 100% (5/5) apresentaram reatividade de anticorpos IgG para ambos, anti-S1 com altos índices de reatividade variando entre 12,3 a 14,1 e anti-rN+RDB entre 1,3 a 5,9. Na coleta 4 (151 dias após o reforço), dos 15 soros cVNT negativos, 100% apresentaram anticorpos

IgG anti -S1 com índice de reatividade variando de 8,7 a 14,7 e 93,3% para rN+RDB, de 1,4 a 6,9.

Figura 27 - Distribuição dos I.R ELISA IgG de acordo com o título de anticorpos neutralizantes detectados pelo teste cVNT-Omicron após as coletas de soro realizadas antes (A, B, C, D) e após o reforço vacinal (E, F, G, H).

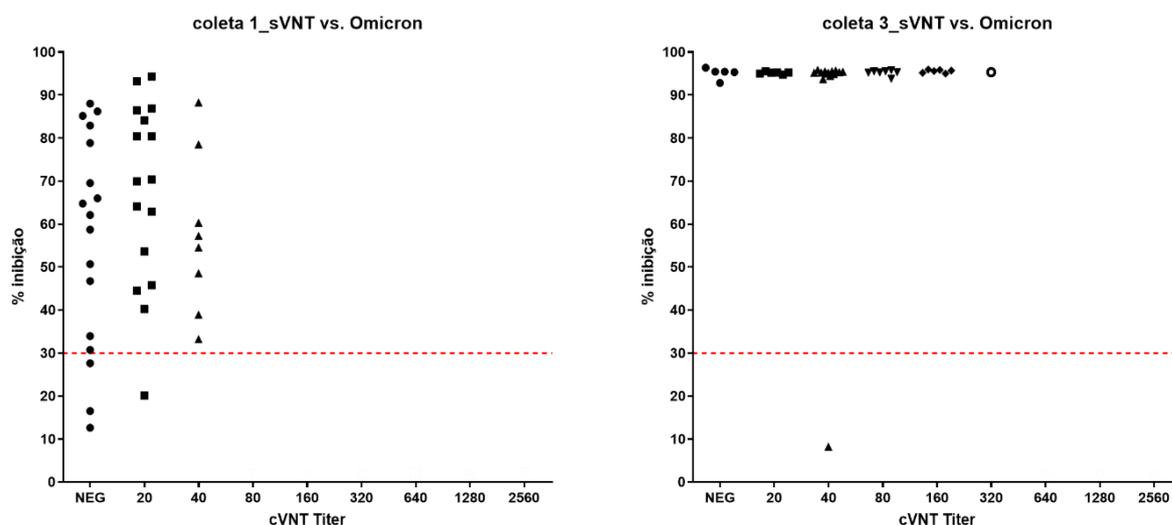


Legenda: Em vermelho: cut-off do teste. NEG = ausência de atividade neutralizante de anticorpos. Os soros foram diluídos à títulos de 1/20 a 1/2560. Coleta 1 (32 dias da 2ª dose vacina CoronaVac) e coleta 2 (186 dias da 2ª dose CoronaVac), coleta 4 (62 dias do reforço Pfizer) e coleta 4 (151 dias do reforço Pfizer)

#### 4.8.2 cVNT e sVNT

Conforme a Figura 28 (abaixo), na coleta 1 (32 dias após CoronaVac), o teste sVNT apresentou porcentagem de inibição variando de 30% a quase 90% naqueles soros com títulos menores do que 1/20 no cVNT (cVNT negativo). A discordância com cVNT negativo foi de 14/17 (82,35%) na coleta 1. Na coleta 3, 61 dias após o reforço vacinal, o teste sVNT discordou do **teste cVNT negativo** em 100% dos soros (5/5), e não foi observada a relação entre títulos de anticorpos neutralizantes e porcentagem de inibição, visto que todos os soros apresentaram porcentagem de inibição maior do que 90% no sVNT distribuídos indistintamente entre os títulos de anticorpos neutralizantes detectados no cVNT após o reforço vacinal.

Figura 28 - Distribuição do percentual de inibição pelo teste sVNT em seus respectivos títulos de anticorpos neutralizantes para a variante Ômicron (cVNT).



Legenda: Em vermelho: cut-off do teste.

## 5 DISCUSSÃO

A urgência em conter a pandemia de COVID-19 levou a uma demanda no desenvolvimento imediato de técnicas diagnósticas acessíveis para aplicação imediata, além de conduzir estudos em tempo real. No contexto da pandemia, os testes sorológicos foram essenciais devido a seus protocolos serem acessíveis em termos de padronização para a aplicação em diferentes laboratórios locais, de baixo custo e ainda, e de tecnologia relativamente simples. Contudo, tem sido fundamental avaliar o desempenho destes testes que refletem a dinâmica da exposição prévia ao SARS-CoV-2 e a medida de anticorpos neutralizantes que fornecem uma base consistente para reestruturar estratégias de enfrentamento das frequentes ameaças de ressurgimento da COVID-19 em populações específicas, especialmente frente às VOCs.

Neste trabalho foi possível avaliar dois protocolos de ELISA que resultaram em excelente acurácia para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 dirigidos a duas formulações diferentes de antígenos recombinantes (S1, rN+RDB). Dessa forma, aplicam-se como uma alternativa acessível para inquéritos sorológicos de monitoramento da exposição da população ao SARS-CoV-2 em diferentes contextos epidemiológicos e para avaliar permanência desses anticorpos anti-SARS-CoV-2 específicos ao longo do tempo. No estudo atual, foi verificado que enquanto a especificidade do teste ELISA IgG anti-S1 foi maior do que anti-rN+RDB, a sua sensibilidade foi menor, de modo que a diferença dessa proporção é relevante em termos de desempenho (107). Diante dessa observação, propomos a combinação dos resultados dos dois testes ELISA IgG anti-S1 e anti-rN+RDB, visto que, frente aos soros controles, essa combinação levou a um aumento de sensibilidade e especificidade para 97,0% e 100%, respectivamente.

Um estudo que foi publicado anteriormente pelo nosso grupo mostra a evidência do melhor desempenho do teste ELISA IgG anti-rN+RDB do que somente anti-rN, desde que anticorpos IgG dirigidos a um único alvo (anti-rN) apresentou inferior desempenho em termos de sensibilidade (90,3%) e especificidade (97,9%) a partir da avaliação do mesmo painel de soros controles que foi empregado no atual estudo (138). Os dados de desempenho dos diferentes alvos de detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 contribuem para elaboração de testes sorológicos acessíveis que possam ser aplicados em grande escala em detectar anticorpos para

múltiplos alvos de SARS-CoV-2, simultaneamente, na mesma amostra biológica. Teses sorológicas *multiplex* baseados na combinação seletiva de alvos ligados em “beads” (microesferas) já têm sido propostos em outras doenças infecciosas, contribuindo para construir mapas de risco, detectar focos importantes de determinada infecção para uma vigilância soropidemiológica mais rigorosa, a fim de estabelecer intervenções específicas e mais eficazes (154).

Em relação ao desempenho destes testes ELISA, uma metanálise baseada no estudo de 16 artigos demonstrou que a sensibilidade média para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 é de 91,6%, variando entre 86% a 95,4% (101). Os parâmetros dos testes ELISA avaliados nesse estudo frente à diferentes pesquisas de anticorpos IgG dirigidos às proteínas recombinantes (rN+RDB e S1) são comparáveis ou superiores a outros achados de testes de ELISA descritos previamente. Caini e colaboradores, em sua revisão analisaram diferentes testes (comerciais e *in-house*) e a menor sensibilidade de detecção de IgG específicos para rN foi 65% utilizando um kit comercial (Beijing Wantai Biologica®, China) (95). Este mesmo estudo baseado na detecção de anticorpos anti-rN descreveu a especificidade de 99% deste teste (99). Alguns autores apontaram que a sensibilidade do teste para IgG anti-*Spike* foi de 74%, e para anticorpos anti-rN 70%. Em relação à especificidade para ambos antígenos, os pesquisadores não relataram nenhum resultado positivo nas suas amostras de indivíduos sadios pré-epidemia, ou seja, 100% de especificidade para rN e *Spike* (155). Outro estudo apresenta a sensibilidade de 67% e especificidade de 96% para anticorpos anti-S1 utilizando outro kit comercial (EUROIMMUN®, Alemanha) (100).

Entretanto, as variações de sensibilidade e especificidade dos testes são originadas, em parte, por interferências ou condições entre laboratórios, principalmente pela falta de homogeneização de critérios para a seleção dos painéis de soros controles para essas análises. Por isso, além da seleção criteriosa de antígenos ou da mistura destes para a pesquisa de anticorpos anti-SARS-CoV-2, outro aspecto que deve ser considerado na análise dos parâmetros de sensibilidade dos testes é a seleção da população do grupo controle estudado. Nosso estudo aplicou os testes em indivíduos previamente expostos com quadro de maior gravidade para COVID-19 e hospitalizados, o que pode diferir em sensibilidade de testes avaliados em soros de populações de exposição comunitária ou quadros leves ou assintomáticos. Essa diferença pode ter sido observada em relação a anticorpos

anti-rN, visto que estudos têm relatado maior produção de anticorpos específicos para o nucleocapsídeo em população de indivíduos que convalesceram a partir de um quadro agudo mais grave da COVID-19 e que demandou de hospitalização em unidade de terapia intensiva (UTI) (156).

Além disso, testes diretos de pesquisa de antígenos incluindo a detecção de rN também demonstraram ser uma estratégia sensível, visto que níveis plasmáticos elevados do antígeno do nucleocapsídeo correlacionaram-se significativamente com a gravidade da doença pulmonar e poderiam indicar replicação viral sistêmica (157). Apesar do SARS-CoV-2 ser propenso a mutações, a proteína da nucleocapsídeo apresenta elevada conservação de aminoácidos com mínimas mutações ao longo do tempo (158). Na era pós pandemia, esta mesma proteína do vírus se apresenta com grande potencial, tanto como alvo na elaboração de testes de diagnóstico quanto para o desenvolvimento de vacinas, em uso tanto sozinho quanto combinado com outros alvos. O alvo N apresenta uma vantagem em relação a proteína Spike, cujo gene que a codifica sofre maior pressão seletiva para a produção de moléculas alteradas, que escapam dos anticorpos neutralizantes (159).

Durante o desenvolvimento do atual estudo, apresentaram-se as primeiras aplicações emergenciais de imunizações adotadas em São Paulo. Nesta ocasião, foram administradas duas doses da vacina com partícula viral completa inativada (CoronaVac®) e um reforço com a formulação vacinal com base em RNAm (Pfizer®), tendo como alvo a molécula S1 do vírus, com a qual a população alvo do estudo foi vacinada entre março de 2021 a março de 2022. Na análise coletiva da pesquisa de anticorpos IgG no grupo de vacinados, especialmente após o *booster* com Pfizer, observa-se um aumento na frequência de anticorpos anti-S1, visto que a formulação vacinal da Pfizer contempla especialmente induzir a produção de anticorpos para esse alvo proteico do vírus (135). Atualmente, a nucleoproteína tem recebido grande atenção como um imunógeno potencial para a vacinação contra SARS-CoV-2 (159). O desafio crescente da disseminação das variantes de SARS-CoV-2 e a persistência limitada da imunidade induzida pelas vacinas de primeira geração exigem urgentemente o desenvolvimento de novas vacinas contra a COVID-19. Atualizar a estrutura vacinal da proteína S para lidar com VOCs é um processo complexo e caro devido a sua variabilidade. Tanto a imunidade das células T como os anticorpos neutralizantes foram identificados como componentes-chave na defesa contra as

cepas selvagens e das VOCs. A nucleoproteína é considerada um imunodominante e associado ao controle da infecção por SARS-CoV-2 com uma resposta robusta das células T. Estudos recentes demonstraram que esta molécula desempenha um papel fundamental no sistema imunológico inato, estimulando as respostas das células T por meio da ativação de FcR e participando na fagocitose durante as infecções naturais (160).

A imunidade induzida pelo estímulo vacinal já foi atribuída anteriormente aos anticorpos neutralizantes pelo fato do bloqueio da entrada viral na célula hospedeira (161,162). Porém, uma das grandes preocupações se encontra na magnitude, capacidade protetora e duração destes anticorpos após a administração das diferentes vacinas para SARS-CoV-2 (161–163). A vacina CoronaVac® é baseada no vírus SARS-CoV-2 ancestral (ou original), sequenciado no início de 2020 (10,164,165). A neutralização viral in vitro contra as variantes Gama, Delta e Ômicron em soros de indivíduos vacinados com a CoronaVac® teve títulos baixos e diminuiu ao longo do tempo, conforme demonstrado neste trabalho. Por outro lado, a vacinação de reforço com o imunizante Pfizer® elevou a frequência dos soros com atividade neutralizantes contra a Ômicron 61 dias após esta dose em 36 vezes (de 2,4% a 87,2%) (144) mas a sua frequência não persistiu visto que foi reduzida em 25 vezes (de 2,4% a 60,5%) na ocasião da coleta subsequente (151 dias após a dose de reforço) (153).

Alguns estudos avaliaram a duração e persistência dos anticorpos neutralizantes contra as 3 variantes do SARS-CoV-2 mencionadas acima, após a administração de diferentes esquemas vacinais (67,166,167). De forma geral, a variante Ômicron demonstrou um grau de escape do sistema imune em diferentes trabalhos após uma ou duas doses vacinais, em diferentes esquemas vacinais (166–172), incluindo os dados do atual estudo que reforçam estes achados (144,153). O total de indivíduos vacinados com CoronaVac®, assim como os títulos de anticorpos neutralizantes foram menores para a variante Ômicron, se comparado às outras variantes (Delta e Gama). Nossos dados corroboram com outros trabalhos que avaliaram os títulos de anticorpos em soro de participantes que receberam a vacina CoronaVac®, demonstrando que, de fato, existe uma queda nos títulos ao longo do tempo (67,166,173). Os dados do atual estudo mostraram que a imunidade humoral induzida por vacinação contra as variantes Gama e Delta também foi curta após duas

doses de CoronaVac®, assim como foi observado em outros esquemas vacinais estudados previamente (163,166,169).

O teste VNT sintético e o teste ELISA IgG anti-S1 apresentaram forte correlação positiva na avaliação dos soros no início do esquema vacinal (coleta 1), mas apresentou correlação nula ao longo do período vacinal analisado, provavelmente devido ao surgimento das VOCs. Estes dois testes mencionados foram os mais discordantes em relação ao teste padrão ouro negativo (cVNT) e ao teste ELISA IgG anti-rN+RDB na ocasião de 32 dias após a vacina CoronaVac, de modo que a possibilidade de VNT sintético estar superestimando a atividade neutralizante não pode ser descartada. Essa hipótese é sustentada também pela observação de que a medida do teste sVNT não correspondeu às variações dos títulos de anticorpos neutralizantes por cVNT. Em adição, mesmo diante de testes de cVNT negativos, houve a manutenção de altas taxas de atividade de inibição da ligação ao ACE sintético pelo soro por sVNT antes ou após a dose de reforço. Estudos anteriores mostraram uma correlação positiva fraca entre o nível de anticorpos detectado por ELISA e o título de cVNT (174). Um estudo chinês encontrou uma correlação moderada dos títulos de cVNT com a medida de IgG anti-*Spike* (anti-S) e anti-nucleoproteína (anti-N) de SARS-CoV-2, sugerindo que o monitoramento dos níveis de anticorpos anti-S e anti-N em associação poderia ser úteis como um indicador indireto de atividade neutralizante (158). Esses estudos têm analisado soros de pacientes que passaram por um quadro sintomático da COVID-19, e destacaram aquelas com uma robusta atividade neutralizante após um quadro clínico mais grave da doença (158).

Nossos dados corroboram com a evidência de que a combinação de testes com alvos diferentes (anti-rN+RDB e anti-S1) seriam úteis para predizer a atividade neutralizante dos anticorpos, incluindo em relação à resposta após a vacinação, desde que apresentaram uma correlação positiva moderada significativa entre estes alvos do ELISA e os testes VNT (convencional e sintético) contra a variante Gama circulante na ocasião da primeira coleta de soro após 32 dias da dose por CoronaVac. Essa correlação passou a ser nula em relação ao teste padrão-ouro com Delta e Ômicron.

Habermann e colaboradores avaliaram o desempenho de três testes comerciais para detecção de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados a partir de um protocolo do hospital universitário Charité em Berlim (Alemanha),

incluindo o teste sVNT usado no nosso trabalho. Os autores concluíram que os testes de neutralização por pseudovírus analisados apresentaram detecção inferior de anticorpos para a variante Ômicron, se comparados a variante original do SARS-CoV-2, assemelhando-se aos nossos resultados com a nossa população de vacinados (175). Por outro lado, um estudo de Kweon e colaboradores compararam o teste cVNT (por cultivo celular) e o teste comercial do sistema VERI-Q SARS-CoV-2, também baseada em porcentagem de inibição como o sVNT, concluíram que ambos métodos apresentam ótima concordância na positividade de anticorpos neutralizantes, e sugere que o método sintético (comercial) como um substituto à técnica tradicional de cultivo celular. Esses autores avaliaram soros de indivíduos que apresentaram COVID-19 ou se encontravam em fase de convalescência (176). Esses dados sugerem possíveis influências da história da infecção natural *versus* vacinação na resposta imune, visto que os testes sintéticos em nosso protocolo de estudo tenderam a superestimar a presença de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados em relação ao teste padrão ouro (cVNT).

A possibilidade do teste sVNT em superestimar a atividade neutralizante pode estar relacionada a medida de apenas um único alvo de anticorpos (anti-S). Por outro lado, o teste VNT convencional (cVNT) baseia-se na neutralização de vírus ativos pelos soros e ainda com a vantagem de utilizar os isolados virais correspondentes às variantes de SARS-CoV-2 circulantes na ocasião. Ainda, um outro motivo seria a limitação da medição da neutralização de anticorpos neutralizantes baseada na porcentagem de inibição entre a ligação ACE e molécula S1. Essa limitação é inerente aos testes semi-quantitativos, como também ocorre em relação ao índice de reatividade dado pelos testes ELISA para pesquisa de IgG anti-SARS-CoV-2. Ao contrário, estudos que aplicaram testes ELISA voltados à quantificação relativa de anticorpos IgG anti-S1 por meio de uma curva padrão têm refletido uma forte correlação positiva com a atividade biológica neutralizante (177) feita por meio de testes de microneutralização usando a cepa B.3 de SARS-CoV-2, obtida em março de 2020 na Alemanha (178).

Uma das contribuições relevantes deste projeto foi a utilização do vírus ativo (vivo) nos ensaios de neutralização viral, o que já é estabelecido como padrão-ouro (179). Além disso, a população de vacinados não apresentou infecção prévia por SARS-CoV-2, o que reforça a validade dos dados obtidos em relação a caracterização

da resposta humoral para SARS-CoV-2 no esquema vacinal (2021-2022) em São Paulo. Esta foi uma grande oportunidade de seguimento em tempo real sobre a caracterização da resposta humoral durante as primeiras formulações de vacinas administradas durante o contexto da pandemia. Estes dados servem como referência aos estudos voltados ao desafio de elaborar novas formulações vacinais, incluindo combinações múltiplas de diferentes imunógenos numa mesma dose que possam induzir a uma imunidade mais duradoura, sendo uma alternativa para superar a dificuldade de lidar com as variações da proteína *Spike* na atualização periódica das vacinas (159,160).

Algumas limitações devem ser apontadas neste trabalho. O restrito número de casos baseado numa casuística de conveniência em relação ao grupo de vacinados não previamente expostos a infecção por SARS-CoV-2. No entanto, é uma análise exploratória importante pois foi iniciada em plena pandemia de SARS-CoV-2, em que selecionar indivíduos elegíveis soronegativos e não expostos previamente ao SARS-CoV-2 por sorologia e/ou biologia molecular foi o primeiro desafio em tempo real. A continuidade dos estudos é necessária para se elucidar o momento da diminuição da positividade de anticorpos ao longo de um tempo superior ao analisado no estudo atual, que abrangeu um período de 1 ano.

Após o tempo de análise do presente estudo, foi observado gradualmente que quase a totalidade dos participantes voluntários (92,7%) foram expostos à infecção natural por SARS-CoV-2 pelo relato de manifestação sintomática da COVID-19, no entanto a análise do desfecho clínico após 1 ano do estudo não fez parte do nosso escopo. A resposta imune humoral foi o enfoque do trabalho, no entanto, componentes celulares e outros mecanismos do sistema imune devem ser caracterizados, como por exemplo o perfil de citocinas e teste de linfoproliferação frente a antígenos específicos do vírus que estão envolvidos na atividade anti-viral, e até o momento poucos trabalhos avaliaram todos estes fatores em conjunto (180,181). Ainda, os testes sorológicos aplicados no estudo foram semi-quantitativos, o que pode restringir a comparação dos testes de forma mais homogênea em relação a real estimativa quantitativa dos anticorpos.

## 6 CONCLUSÃO

Em relação aos resultados obtidos em nosso estudo, foi possível concluir que:

- Os testes sorológicos utilizados para a avaliação de anticorpos IgG anti-rN+RDB e anti-S1 apresentaram alta acurácia, principalmente quando analisados em conjunto, o que nos permite propor que possam ser utilizados de forma segura em inquéritos sorológicos de monitoramento da exposição da população ao SARS-CoV-2;

- Os achados deste trabalho nos permitem concluir pela importância de estratégias vacinais complementares e contínuas no sentido de fortalecer a imunidade contra o SARS-CoV 2 ao longo do tempo;

-O teste VNT sintético não apresentou boa correlação com o teste VNT convencional, superestimando a presença de anticorpos neutralizantes, sugerindo não ser uma alternativa eficaz ao teste VNT convencional

## 7 REFERÊNCIAS

1. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
2. 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. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
3. Lu H, Stratton CW, Tang Y. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Apr 12;92(4):401–2. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25678>
4. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 Feb;91:264–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220300114>
5. 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* [Internet]. 2020 Feb 20;382(8):727–33. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>
6. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb;395(10223):470–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301859>
7. Yang L, Wu Z, Ren X, Yang F, He G, Zhang J, et al. Novel SARS-like betacoronaviruses in bats, China, 2011. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Jun;19(6):989–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739658>
8. Li W. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* (80- ) [Internet]. 2005 Oct 28;310(5748):676–9. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1118391>

9. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. Springer US; 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
10. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. Springer Nature; 2020;579(7798):265–9.
11. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* [Internet]. 2021 Apr 15;592(7854):438–43. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03402-9>
12. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, 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* [Internet]. 2020; Available from: <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>
13. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* [Internet]. 2021 May 13;593(7858):266–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03470-x>
14. Faria NR, Claro IM, Candido D, Moyses Franco LA, Andrade PS, Coletti TM, et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. *Virological.org* [Internet]. 2021; Available from: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>
15. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* (80- ) [Internet]. 2021 May 21;372(6544):815–21. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abh2644>
16. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26(4):450–2.

17. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2023 [cited 2023 Feb 8]. Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
18. WHO. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 17]. Available from: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)
19. Saúde M da. Painel Coronavírus [Internet]. 2023 [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://covid.saude.gov.br/>
20. WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2023 [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://covid19.who.int/table>
21. Mathieu E, Ritchie H, Rodés-Guirao L, Appel C, Giattino C, Hasell J, et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19) [Internet]. 2020 [cited 2023 Dec 8]. Available from: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
22. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2005 Dec;69(4):635–64. Available from: <https://mmlbr.asm.org/content/69/4/635>
23. Wang L-F, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton B. Review of Bats and SARS. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006;12(12):1834–40. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/12/06-0401\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/12/06-0401_article.htm)
24. Lim XF, Lee CB, Pascoe SM, How CB, Chan S, Tan JH, et al. Detection and characterization of a novel bat-borne coronavirus in Singapore using multiple molecular approaches. *J Gen Virol* [Internet]. 2019 Oct 1;100(10):1363–74. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001307>
25. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* [Internet]. 2016 Jun;24(6):490–502. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16000718>
26. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: *Advances in virus research* [Internet]. 2018. p. 163–

88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29551135>
27. Cherry JD, Krogstad P. SARS: The First Pandemic of the 21st Century. *Pediatr Res* [Internet]. 2004 Jul;56(1):1–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/01.PDR.0000129184.87042.FC>
28. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2003 Mar 28;52(12):241–6, 248. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680518>
29. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Nov 8;367(19):1814–20. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1211721>
30. Raj VS, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL. MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2014 Apr;5:58–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187962571400011X>
31. Knipe D, Howley P. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 1305-1335 p.
32. Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Rev Med Virol* [Internet]. 2022 Jul 9;32(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2313>
33. Goldsmith CS, Miller SE, Martines RB, Bullock HA, Zaki SR. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task [Internet]. Vol. 395, *The Lancet*. 2020. p. e99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620311880>
34. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*. 2020;42(1):3–11.
35. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. Vol. 7, *Military Medical Research*. Military Medical Research; 2020. p. 1–10.
36. Huo J, Le Bas A, Ruza RR, Duyvesteyn HME, Mikolajek H, Malinauskas T, et al.

- Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2020 Sep 13;27(9):846–54. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41594-020-0469-6>
37. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* [Internet]. 1997;48:1–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233431>
  38. TYRRELL DA, BYNOE ML. CULTIVATION OF A NOVEL TYPE OF COMMON-COLD VIRUS IN ORGAN CULTURES. *Br Med J* [Internet]. 1965 Jun 5;1(5448):1467–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14288084>
  39. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;395(10224):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
  40. Kumar S, Nyodu R, Maurya VK, Saxena SK. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In 2020. p. 23–31. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4814-7\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4814-7_3)
  41. Helmy YA, Fawzy M, Elaswad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Apr 24;9(4):1225. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/4/1225>
  42. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* [Internet]. 2003 Nov;426(6965):450–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature02145>
  43. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem* [Internet]. 2020;295(37):12910–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32661197>
  44. Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses.

- RNA Biol [Internet]. 2011 Mar 27;8(2):270–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/rna.8.2.15013>
45. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 May 26;117(21):11727–34. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.2003138117>
46. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* [Internet]. 2020;369:m1443. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32317267>
47. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jul 9;383(2):120–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2015432>
48. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* [Internet]. 2020 Jul;191:145–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384820301201>
49. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, et al. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect* [Internet]. 2020 Aug;81(2):e16–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445320302346>
50. Gralinski LE, Menachery VD. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020;12(2):1–8.
51. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb;395(10223):507–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620302117>
52. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*

- [Internet]. 2020 May 28;581(7809):465–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>
53. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc. American Medical Association*; 2020 Mar 17;323(11):1061–9.
  54. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, 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. *Lancet. Lancet Publishing Group*; 2020 Feb 15;395(10223):514–23.
  55. Puntmann VO, Carerj ML, Wieters I, Fahim M, Arendt C, Hoffmann J, et al. Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* [Internet]. 2020 Nov 1;5(11):1265–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32730619>
  56. Rifino N, Censori B, Agazzi E, Alimonti D, Bonito V, Camera G, et al. Neurologic manifestations in 1760 COVID-19 patients admitted to Papa Giovanni XXIII Hospital, Bergamo, Italy. *J Neurol* [Internet]. 2020 Oct 7; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33026520>
  57. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* [Internet]. 2020;41(12):1100–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33132005>
  58. SEADE. SEADE - Coronavírus [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.seade.gov.br/coronavirus/>
  59. Chatterjee S, Bhattacharya M, Nag S, Dhama K, Chakraborty C. A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses*. 2023 Jan 5;15(1):167.
  60. Silva SJR da, Pena L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. *One Heal* [Internet]. 2021 Dec;13:100287. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235277142100077X>
61. Gidari A, Sabbatini S, Bastianelli S, Pierucci S, Busti C, Monari C, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 and P.1 variants in vaccinated, convalescent and P.1 infected. *J Infect* [Internet]. 2021 Oct;83(4):467–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445321003625>
  62. Ranzani OT, Hitchings MDT, Dorion M, D'Agostini TL, de Paula RC, de Paula OFP, et al. Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study. *BMJ* [Internet]. 2021 Aug 20;n2015. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.n2015>
  63. CDC. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant — United States, December 1–8, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Dec 17;70(50):1731–4. Available from: [http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7050e1.htm?s\\_cid=mm7050e1\\_w](http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7050e1.htm?s_cid=mm7050e1_w)
  64. Islam F, Dhawan M, Nafady MH, Emran T Bin, Mitra S, Choudhary OP, et al. Understanding the omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutational impacts, concerns, and the possible solutions. *Ann Med Surg* [Internet]. 2022 Jun;78:103737. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2049080122004976>
  65. Bhattacharya M, Sharma AR, Dhama K, Agoramoorthy G, Chakraborty C. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: understanding mutations in the genome, S-glycoprotein, and antibody-binding regions. *GeroScience* [Internet]. 2022 Apr 8;44(2):619–37. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11357-022-00532-4>
  66. Chakraborty C, Bhattacharya M, Sharma AR, Mallik B. Omicron (B.1.1.529) - A new heavily mutated variant: Mapped location and probable properties of its mutations with an emphasis on S-glycoprotein. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2022 Oct;219:980–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813022017081>
  67. Pérez-Then E, Lucas C, Monteiro VS, Miric M, Brache V, Cochon L, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination. *Nat Med*

- [Internet]. 2022 Mar 20;28(3):481–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-022-01705-6>
68. Chatterjee S, Bhattacharya M, Nag S, Dhama K, Chakraborty C. A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses* [Internet]. 2023 Jan 5;15(1):167. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/1/167>
69. Wilhelm A, Widera M, Grikscheit K, Toptan T, Schenk B, Pallas C, et al. Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies. *eBioMedicine* [Internet]. 2022 Aug;82:104158. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396422003395>
70. Rahman S, Hossain MJ, Nahar Z, Shahriar M, Bhuiyan MA, Islam MR. Emerging SARS-CoV-2 Variants and Subvariants: Challenges and Opportunities in the Context of COVID-19 Pandemic. *Environ Health Insights* [Internet]. 2022 Jan 20;16:117863022211293. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/11786302221129396>
71. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 6; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
72. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem* [Internet]. 2020;66(4):549–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32031583>
73. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2020 Jan 23;25(3).
74. Pfefferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Mar 5;25(9). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560->

7917.ES.2020.25.9.2000152

75. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020;71(15):778–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32198501>
76. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;20(5):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
77. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020;9(1):386–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32065057>
78. Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, Corry H, Wong C, Rosenthal A, et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Oct 30;11(1):5493. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-19057-5>
79. Mendes-Correa MC, Salomão MC, Ghilardi F, Tozetto-Mendoza TR, Santos Villas-Boas L, de Paula AV, et al. SARS-CoV-2 Detection and Culture in Different Biological Specimens from Immunocompetent and Immunosuppressed COVID-19 Patients Infected with Two Different Viral Strains. *Viruses* [Internet]. 2023 May 29;15(6):1270. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/6/1270>
80. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking Covid-19 Test Sensitivity — A Strategy for Containment. *N Engl J Med*. 2020 Nov 26;383(22):e120.
81. Bekliz M, Adea K, Puhach O, Perez-Rodriguez F, Marques Melancia S, Baggio S, et al. Analytical Sensitivity of Eight Different SARS-CoV-2 Antigen-Detecting Rapid Tests for Omicron-BA.1 Variant. *Microbiol Spectr*. 2022 Aug 31;10(4).
82. WHO. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of->

sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays

83. Addetia A, Crawford KHD, Dingens A, Zhu H, Roychoudhury P, Huang M-L, et al. Neutralizing Antibodies Correlate with Protection from SARS-CoV-2 in Humans during a Fishery Vessel Outbreak with a High Attack Rate. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 21;58(11). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02107-20>
84. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 17;11(1):4704. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-18450-4>
85. Wagatsuma K, Yoshioka S, Yamazaki S, Sato R, Phyu WW, Chon I, et al. Assessing the Pre-Vaccination Anti-SARS-CoV-2 IgG Seroprevalence among Residents and Staff in Nursing Home in Niigata, Japan, November 2020. *Viruses* [Internet]. 2022 Nov 21;14(11):2581. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/11/2581>
86. Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 4;11(1):2251. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-16256-y>
87. Ju B, Zhang Q, Ge J, Wang R, Sun J, Ge X, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 6;584(7819):115–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2380-z>
88. Pilz S, Theiler-Schwetz V, Trummer C, Krause R, Ioannidis JPA. SARS-CoV-2 reinfections: Overview of efficacy and duration of natural and hybrid immunity. *Environ Res* [Internet]. 2022 Jun;209:112911. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935122002389>
89. Rostami A, Sepidarkish M, Fazlzadeh A, Mokdad AH, Sattarnejhad A, Esfandyari S, et al. Update on SARS-CoV-2 seroprevalence: regional and worldwide. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Dec;27(12):1762–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X21005395>

90. Azami M, Moradi Y, Moradkhani A, Aghaei A. SARS-CoV-2 seroprevalence around the world: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res* [Internet]. 2022 Dec 2;27(1):81. Available from: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-022-00710-2>
91. Venugopal U, Jilani N, Rabah S, Shariff MA, Jawed M, Mendez Batres A, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence among health care workers in a New York City hospital: A cross-sectional analysis during the COVID-19 pandemic. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021 Jan;102:63–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220322402>
92. Ye X, Angelo LS, Nicholson EG, Iwuchukwu OP, Cabral de Rezende W, Rajan A, et al. Serum IgG anti-SARS-CoV-2 Binding Antibody Level Is Strongly Associated With IgA and Functional Antibody Levels in Adults Infected With SARS-CoV-2. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Oct 8;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.693462/full>
93. Rodeles LM, Peverengo LM, Benítez R, Benzaquen N, Serravalle P, Long AK, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG in asymptomatic and pauci-symptomatic people over a 5 month survey in Argentina. *Rev Panam Salud Pública* [Internet]. 2021 Jun 21;45:1. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54288>
94. Lin D, Liu L, Zhang M, Hu Y, Yang Q, Guo J, et al. Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 Dec 17;39(12):2271–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-020-03978-6>
95. Caini S, Bellerba F, Corso F, Díaz-Basabe A, Natoli G, Paget J, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Jun 11;25(23). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2000980>
96. Tré-Hardy M, Wilmet A, Beukinga I, Dogné JM, Douxfils J, Blairon L. Validation of a chemiluminescent assay for specific SARS-CoV-2 antibody. *Clin Chem Lab*

- Med. 2020 Jul;58(8):1357–64.
97. Padoan A, Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, Faggian D, Plebani M. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun;58(7):1081–8.
  98. Kanta P, Ghosh A, Goyal K, Kaur R, Baluni M, Sircar S, et al. Effect of storage temperatures simulating transport conditions of nasopharyngeal swabs on the results of a chemiluminescence immunoassay (CLIA) to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antigen. *Indian J Med Microbiol*. 2023 Jul;44:100379.
  99. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis [Internet]*. 2020 Nov 19;71(16):2027–34. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/71/16/2027/5812996>
  100. Lassaunière R, Frische A, Harboe ZB, Nielsen ACY, Fomsgaard A, Krogfelt KA, et al. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *medRxiv*. 2020;1–15.
  101. Böger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control [Internet]*. 2021 Jan;49(1):21–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655320306933>
  102. Liu B, Su X, Yu G, Yang S, Wang F, Huang T, et al. An automated chemiluminescent immunoassay (CLIA) detects SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels in COVID-19 patients and vaccinees. *Int J Infect Dis*. 2022 Feb;115:116–25.
  103. Hernández-Bello J, Sierra-García-de-Quevedo JJ, Morales-Núñez JJ, Santoscoy-Ascencio G, Díaz-Pérez SA, Gutiérrez-Brito JA, et al. BNT162b2 Vaccination after SARS-CoV-2 Infection Changes the Dynamics of Total and Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2: A 6-Month Prospective Cohort Study. *Vaccines*. 2023 Jun;11(6):1127.
  104. Naeimi R, Sepidarkish M, Mollalo A, Parsa H, Mahjour S, Safarpour F, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence in children worldwide: A systematic review and

- meta-analysis. *eClinicalMedicine*. 2023 Feb;56:101786.
105. Infantino M, Grossi V, Lari B, Bambi R, Perri A, Manneschi M, et al. Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an Italian experience. *J Med Virol*. 2020 Sep;92(9):1671–5.
  106. Weber MC, Risch M, Thiel SL, Grossmann K, Nigg S, Wohlwend N, et al. Characteristics of Three Different Chemiluminescence Assays for Testing for SARS-CoV-2 Antibodies. Liu Z, editor. *Dis Markers*. 2021 Jan;2021:1–13.
  107. Ferreira AW. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
  108. Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Jul 23;58(8). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00797-20>
  109. Trombetta H, Faggion HZ, Leotte J, Nogueira MB, Vidal LRR, Raboni SM. Human coronavirus and severe acute respiratory infection in Southern Brazil. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2016 Apr 2;110(3):113–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20477724.2016.1181294>
  110. Lee E, Sandgren K, Duette G, Stylianou V V., Khanna R, Eden J-S, et al. Identification of SARS-CoV-2 Nucleocapsid and Spike T-Cell Epitopes for Assessing T-Cell Immunity. Subbarao K, editor. *J Virol* [Internet]. 2021 Feb 24;95(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02002-20>
  111. He J, Huang J, Zhang Y, Zhang J. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein intranasal inoculation induces local and systemic T cell responses in mice. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Apr 11;93(4):1923–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26769>
  112. Kuwentrai C, Yu J, Zhang B, Hu Y, Dou Y, Gong H, et al. Induction of Humoral and Cellular Immunity by Intradermal Delivery of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Using Dissolvable Microneedles. Milito C, editor. *J Immunol Res* [Internet]. 2021 May 17;2021:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2021/5531220/>

113. Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, et al. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res* [Internet]. 2021 Jun;232:60–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524421000293>
114. Deng T, Li T, Chen G, Zhu Y, Xu L, Lin Y, et al. Characterization and immunogenicity of SARS-CoV-2 spike proteins with varied glycosylation. *Vaccine* [Internet]. 2022 Nov;40(47):6839–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X22011665>
115. Yuchun N, Guangwen W, Xuanling S, Hong Z, Yan Q, Zhongping H, et al. Neutralizing Antibodies in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Sep 15;190(6):1119–26. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/190/6/1119/919111>
116. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol* [Internet]. 2003 Aug 15;77(16):8801–11. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
117. Xia S, Yan L, Xu W, Agrawal AS, Algaissi A, Tseng C-TK, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv* [Internet]. 2019 Apr 5;5(4). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aav4580>
118. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallesen J, Yassine HM, Turner HL, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* [Internet]. 2016 Mar 2;531(7592):118–21. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature17200>
119. Raoufi E, Hosseini F, Onagh B, Salehi-Shadkami M, Mehrali M, Mohsenzadegan M, et al. Designing and developing a sensitive and specific SARS-CoV-2 RBD IgG detection kit for identifying positive human samples. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2023 Mar;542:117279. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898123000815>

120. Patel EU, Bloch EM, Clarke W, Hsieh Y-H, Boon D, Eby Y, et al. Comparative Performance of Five Commercially Available Serologic Assays To Detect Antibodies to SARS-CoV-2 and Identify Individuals with High Neutralizing Titers. Loeffelholz MJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2021 Jan 21;59(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02257-20>
121. Klein SL, Pekosz A, Park HS, Ursin RL, Shapiro JR, Benner SE, et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population. *J Clin Invest* [Internet]. 2020 Oct 19;130(11):6141–50. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/142004>
122. Luchsinger LL, Ransegnola BP, Jin DK, Muecksch F, Weisblum Y, Bao W, et al. Serological assays estimate highly variable SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity in recovered COVID-19 patients. Loeffelholz MJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Nov 18;58(12). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02005-20>
123. Meschi S, Colavita F, Bordi L, Matusali G, Lapa D, Amendola A, et al. Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *J Clin Virol* [Internet]. 2020 Aug;129:104539. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138665322030281X>
124. Ng DL, Goldgof GM, Shy BR, Levine AG, Balcerek J, Bapat SP, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood. *Nat Commun*. 2020 Sep 17;11(1):4698.
125. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* [Internet]. 2020 Jun 9;323(22):2249–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32374370>
126. Hammerschmidt SI, Thurm C, Bošnjak B, Bernhardt G, Reinhold A, Willenzon S, et al. Robust induction of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta variant after homologous Spikevax or heterologous Vaxzevria-Spikevax vaccination. *Eur J Immunol* [Internet]. 2022 Jan 7; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202149645>
127. Lau EHY, Tsang OTY, Hui DSC, Kwan MYW, Chan W, Chiu SS, et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* [Internet].

- 2021 Dec 4;12(1):63. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-20247-4>
128. Özçürümez MK, Ambrosch A, Frey O, Haselmann V, Holdenrieder S, Kiehntopf M, et al. SARS-CoV-2 antibody testing—questions to be asked. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2020 Jul;146(1):35–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674920307399>
129. Brochot E, Demey B, Touzé A, Belouzard S, Dubuisson J, Schmit J-L, et al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 19;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.584251/full>
130. Millet J, Whittaker G. Murine Leukemia Virus (MLV)-based Coronavirus Spike-pseudotyped Particle Production and Infection. *BIO-PROTOCOL* [Internet]. 2016;6(23). Available from: <https://bio-protocol.org/e2035>
131. Perera RA, Mok CK, Tsang OT, Lv H, Ko RL, Wu NC, et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Apr 23;25(16). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.2000421>
132. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 20;584(7821):437–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2456-9>
133. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* (80- ) [Internet]. 2020 Jul 3;369(6499):77–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32376603>
134. Fernandes EG, López-Lopes GIS, Silva VO, Yamashiro R, Madureira KCR, Gallo JF, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in inadvertently vaccinated healthy children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2021;63. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-)

46652021000100609&tlng=en

135. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 31;383(27):2603–15.
136. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Dec 17;383(25):2439–50. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2027906>
137. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release* [Internet]. 2015 Nov;217:345–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915300535>
138. Tozetto-Mendoza TR, Kanunfre KA, Vilas-Boas LS, Sanchez Espinoza EP, Paião HGO, Rocha MC, et al. Nucleoprotein-based ELISA for detection of SARS-COV-2 IgG antibodies: Could an old assay be suitable for serodiagnosis of the new coronavirus? *J Virol Methods* [Internet]. 2021 Apr;290:114064. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093421000033>
139. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol*. 2022 Feb 1;75(1):25–36.
140. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. 2010 Sep;5(9):1315–6.
141. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* [Internet]. 2000 May;45(1–2):23–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016758770000115X>
142. Fosgate GT, Scott HM, Jordan ER. Development of a method for Bayesian nonparametric ROC analysis with application to an ELISA for Johne’s disease in dairy cattle. *Prev Vet Med* [Internet]. 2007 Sep;81(1–3):178–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167587707000748>
143. Trifonova OP, Lokhov PG, Archakov AI. Metabolic profiling of human blood [Internet]. Vol. 7, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical*

- Chemistry. 2013. p. 179–86. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1990750813030128>
144. Da Silva AR, Villas-Boas LS, Tozetto-Mendoza TR, Honorato L, De Paula A, Witkin SS, et al. Generation of neutralizing antibodies against Omicron, Gamma and Delta SARS-CoV-2 variants following CoronaVac vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2022;64. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652022000100207&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652022000100207&tlng=en)
145. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. In: *Virology Methods Manual*. Elsevier; 1996. p. 25–46.
146. Wendel S, Kutner JM, Machado R, Fontão-Wendel R, Bub C, Fachini R, et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. *Transfusion* [Internet]. 2020 Dec 16;60(12):2938–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.16065>
147. Mendrone-Junior A, Dinardo CL, Ferreira SC, Nishya A, Salles NA, Almeida Neto C, et al. Correlation between SARS-COV-2 antibody screening by immunoassay and neutralizing antibody testing. *Transfusion* [Internet]. 2021 Apr 25;61(4):1181–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.16268>
148. Nurtop E, Villarroel PMS, Pastorino B, Ninove L, Drexler JF, Roca Y, et al. Combination of ELISA screening and seroneutralisation tests to expedite Zika virus seroprevalence studies. *Virology J* [Internet]. 2018 Dec 27;15(1):192. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-018-1105-5>
149. Schober P, Schwarte LA. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesth Analg* [Internet]. 2018 May;126(5):1763–8. Available from: <https://journals.lww.com/00000539-201805000-00050>
150. Tanni SE, Patino CM, Ferreira JC. Correlation vs. regression in association studies [Internet]. Vol. 46, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2020. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132020000100151&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132020000100151&tlng=en)

151. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012 Sep;24(3):69–71.
152. LaMorte W. Correlation and Regression - Evaluating Association Between Two Continuous Variables [Internet]. 2021 [cited 2024 Jan 18]. Available from: <https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH717-QuantCore/PH717-Module9-Correlation-Regression/PH717-Module9-Correlation-Regression4.html>
153. Silva Jr AR da, Villas-Boas LS, Paula AV de, Tozetto-Mendoza TR, Honorato L, Witkin SS, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant following two CoronaVac vaccinations and a Pfizer/BioNTech mRNA vaccine booster. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2022;64. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652022000100700&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652022000100700&tIng=en)
154. Rogier EW, Giorgi E, Tetteh K, Sepúlveda N. Editorial: Current research on serological analyses of infectious diseases. *Front Med* [Internet]. 2023 Feb 17;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1154584/full>
155. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Mar 30;58(6). Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00461-20>
156. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res* [Internet]. 2020 Dec 13;7(1):11. Available from: <https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-020-00240-0>
157. Rogers AJ, Wentworth D, Phillips A, Shaw-Saliba K, Dewar RL, Aggarwal NR, et al. The Association of Baseline Plasma SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen Level and Outcomes in Patients Hospitalized With COVID-19. *Ann Intern Med* [Internet]. 2022 Oct;175(10):1401–10. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M22-0924>

158. Wang P, Liu L, Nair MS, Yin MT, Luo Y, Wang Q, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):2091–3. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1823890>
159. Song W, Fang Z, Ma F, Li J, Huang Z, Zhang Y, et al. The role of SARS-CoV-2 N protein in diagnosis and vaccination in the context of emerging variants: present status and prospects. *Front Microbiol* [Internet]. 2023 Aug 14;14:1217567. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1217567/full>
160. Maghsood F, Ghorbani A, Yadegari H, Golsaz-Shirazi F, Amiri MM, Shokri F. SARS-CoV-2 nucleocapsid: Biological functions and implication for disease diagnosis and vaccine design. *Rev Med Virol* [Internet]. 2023 May 15;33(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2431>
161. Dong Y, Dai T, Wei Y, Zhang L, Zheng M, Zhou F. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Dec 13;5(1):237.
162. Naaber P, Tserel L, Kangro K, Sepp E, Jürjenson V, Adamson A, et al. Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *Lancet Reg Heal - Eur* [Internet]. 2021 Nov;10:100208. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S266677622100185X>
163. Cevik M, Grubaugh ND, Iwasaki A, Openshaw P. COVID-19 vaccines: Keeping pace with SARS-CoV-2 variants. *Cell* [Internet]. 2021 Sep;184(20):5077–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421010576>
164. Schmidt F, Weisblum Y, Rutkowska M, Poston D, DaSilva J, Zhang F, et al. High genetic barrier to SARS-CoV-2 polyclonal neutralizing antibody escape. *Nature* [Internet]. 2021 Dec 16;600(7889):512–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04005-0>
165. Chen L, Liu W, Zhang Q, Xu K, Ye G, Wu W, et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):313–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1725399>

166. Wang Y, Ma Y, Xu Y, Liu J, Li X, Chen Y, et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2022 Dec 31;11(1):425–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2022.2027219>
167. Ai J, Zhang H, Zhang Y, Lin K, Zhang Y, Wu J, et al. Omicron variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARS-CoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2022 Dec 31;11(1):337–43. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2021.2022440>
168. Schmidt F, Muecksch F, Weisblum Y, Da Silva J, Bednarski E, Cho A, et al. Plasma Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron Variant. *N Engl J Med* [Internet]. 2022 Feb 10;386(6):599–601. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2119641>
169. Dejnirattisai W, Shaw RH, Supasa P, Liu C, Stuart AS, Pollard AJ, et al. Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B.1.1.529 variant by post-immunisation serum. *Lancet* [Internet]. 2022 Jan;399(10321):234–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621028440>
170. Lusvarghi S, Pollett SD, Neerukonda SN, Wang W, Wang R, Vassell R, et al. SARS-CoV-2 Omicron neutralization by therapeutic antibodies, convalescent sera, and post-mRNA vaccine booster. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2021 Dec 28;
171. Syed AM, Ciling A, Taha TY, Chen IP, Khalid MM, Sreekumar B, et al. Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci*. 2022 Aug 2;119(31).
172. Cheng SMS, Mok CKP, Leung YWY, Ng SS, Chan KCK, Ko FW, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nat Med* [Internet]. 2022 Mar 20;28(3):486–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-022-01704-7>
173. Lu L, Mok BWY, Chen LL, Chan JMC, Tsang OTY, Lam BHS, et al. Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2022 Aug 24;75(1):e822–6. Available from:

- <https://academic.oup.com/cid/article/75/1/e822/6463504>
174. Vilibic-Cavlek T, Stevanovic V, Ilic M, Barbic L, Capak K, Tabain I, et al. SARS-CoV-2 Seroprevalence and Neutralizing Antibody Response after the First and Second COVID-19 Pandemic Wave in Croatia. *Pathogens* [Internet]. 2021 Jun 20;10(6):774. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/6/774>
  175. Habermann E, Frommert LM, Ghannam K, Nguyen My L, Gieselmann L, Tober-Lau P, et al. Performance of commercial SARS-CoV-2 wild-type and Omicron BA.1 antibody assays compared with pseudovirus neutralization tests. *J Clin Virol* [Internet]. 2023 Aug;165:105518. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653223001415>
  176. Kweon OJ, Bae J-Y, Lim YK, Choi Y, Lee S, Park M-S, et al. Performance evaluation of newly developed surrogate virus neutralization tests for detecting neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Sci Rep* [Internet]. 2023 Mar 27;13(1):4961. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-31114-9>
  177. Dolscheid-Pommerich R, Bartok E, Renn M, Kümmerer BM, Schulte B, Schmithausen RM, et al. Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity. *J Med Virol* [Internet]. 2022 Jan 31;94(1):388–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27287>
  178. Streeck H, Schulte B, Kümmerer BM, Richter E, Höller T, Fuhrmann C, et al. Infection fatality rate of SARS-CoV2 in a super-spreading event in Germany. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Nov 17;11(1):5829. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-19509-y>
  179. Pang NY-L, Pang AS-R, Chow VT, Wang D-Y. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Mil Med Res* [Internet]. 2021 Dec 31;8(1):47. Available from: <https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-021-00342-3>
  180. Suzuki R, Yamasoba D, Kimura I, Wang L, Kishimoto M, Ito J, et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature* [Internet]. 2022 Mar 24;603(7902):700–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04462-1>

181. Liwsrisakun C, Pata S, Laopajon W, Takheaw N. Humoral and cellular immune responses against SARS-CoV-2 variants of concern induced by heterologous CoronaVac/ChAdOx-1 versus homologous ChAdOx-1 vaccination in the elderly. *Asian Pacific J Allergy Immunol* [Internet]. 2023; Available from: <https://apjai-journal.org/wp-content/uploads/2023/02/AP-120822-1434.pdf>

## 8 ANEXOS

### 8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

#### **DADOS DA PESQUISA**

**Título da pesquisa - “Desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV2 (Covid 19): aplicação no diagnóstico da infecção e aplicação em estudos soroepidemiológicos”**

Pesquisador principal – Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Correa      INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52275

Departamento/Instituto - Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da FMUSP

Convite à participação –

Você está sendo convidado a participar do estudo que tem o seguinte nome **“Desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV2 (Covid 19): aplicação no diagnóstico da infecção e em estudos soroepidemiológicos.”**

**Justificativa e objetivos do estudo** – Ao realizar essa pesquisa para a qual você está sendo convidado, nós pretendemos descobrir, se você, **QUE TEVE A INFECÇÃO CONFIRMADA** pelo SARSCoV2, ou se você, **QUE FOI VACINADO** para a infecção pelo SARSCoV2 foi capaz de produzir anticorpos para essa infecção/vacina.

A investigação desses anticorpos vai nos ajudar a descobrir se A INFECÇÃO pelo SARSCoV2 ou se A VACINAÇÃO PARA ELE ( SARSCoV2) é capaz de algum tipo de proteção, através da produção desses anticorpos.

Anticorpos são substâncias que normalmente o corpo humano produz e que são capazes de proteger essa pessoa para futuras infecções pelo mesmo vírus. Essa informação é muito importante, para podermos entender como o vírus se espalha entre nós, e em nossa comunidade e para saber se estamos protegidos após uma primeira infecção. Isto pode nos ajudar a entender o que está acontecendo entre nós.

#### **Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – VOCÊ QUE TEVE A COVID 19**

Caso você concorde em participar do estudo, nós iremos realizar coletar 20 mL de sangue (~4 colheres de sopa). Nesta amostra iremos realizar os exames necessários para entender como está acontecendo a produção de anticorpos contra o coronavírus no seu corpo. Durante o procedimento, utilizaremos os somente material descartável, sem nenhum risco de contaminação para você. Pretendemos (se você concordar) realizar 5 coletas de sangue, durante seu acompanhamento clínico, em cinco ocasiões diferentes: no dia do seu diagnóstico, cerca de 7 , 21 , 28 , 120 , **180 e 240 dias após o início da infecção.**

Todas as coletas serão realizadas durante seu atendimento no ambulatório, para consultas de rotina. Caso alguma coleta ocorra fora do seu atendimento ambulatorial de rotina, um profissional da saúde, habilitado para esse fim, irá até seu domicílio (ou outro local de sua preferência) ou faremos um reembolso de suas despesas, relativo à locomoção do mesmo (e acompanhante, se necessário), até o local de coleta, se você preferir. Além disso, com sua permissão iremos consultar você e os dados relativos à sua doença (tipo de sintomas, tempo de doença, tratamento usado e se houve alguma complicação durante seu acompanhamento) no seu prontuário médico, para podermos entender melhor o que aconteceu com você.

## **VOCÊ QUE FOI VACINADO PARA A INFECÇÃO PELO SARS COV 2**

Caso você concorde em participar do estudo, nós iremos realizar coletar 20 mL de sangue (~4 colheres de sopa). Nesta amostra iremos realizar os exames necessários para entender como está acontecendo a produção de anticorpos contra o coronavírus no seu corpo.

Durante o procedimento, utilizaremos somente material descartável, sem nenhum risco de contaminação para você. **Pretendemos (se você concordar) realizar 2 coletas de sangue, durante seu acompanhamento clínico, em duas ocasiões diferentes: antes da primeira dose da vacina (período mínimo de até 1 dia e máximo até 28 dias), e 180 dias após a segunda dose da vacina.**

**Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa** – A coleta de sangue pode causar uma leve dor quando a agulha for inserida em uma veia para coletar o sangue, mas isso geralmente não dura muito tempo. Depois que o sangue é coletado, pode haver um pequeno hematoma onde a agulha foi inserida, que pode durar algumas horas ou dias. Em ocasiões muito raras pode haver uma pequena lesão ou infecção onde a agulha foi inserida.

Nenhuma informação obtida durante essa pesquisa, seja relativa à sua identificação pessoal, seja relativa aos seus resultados pessoais, será em nenhuma circunstância divulgada de forma individual, fora da pesquisa. Todas as informações não serão relacionadas à sua pessoa, mas serão analisadas como um todo. Somente você e os responsáveis por essa pesquisa terão acesso às suas informações, geradas ou conhecidas durante a realização desse estudo.

Benefícios esperados para o participante –

**Benefícios para o participante:** Não há nenhum benefício direto pela sua participação nesse estudo.

**Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa** – Você será informado sobre todas as informações que forem obtidas durante essa pesquisa e também será informado quando essa pesquisa se concluir, podendo retirar sua participação quando quiser, sem nenhum prejuízo para seu acompanhamento clínico. Você receberá uma via deste documento, para ficar com você, de forma que poderá consultar o que aqui está escrito a qualquer momento. Você não terá qualquer despesa para a participação dessa pesquisa, como voluntário.

Você concordaria que o material coletado nesta pesquisa possa ser utilizado em outras pesquisas? Sim  
( ) Não ( )

Caso você concorde, saiba que essa utilização só seria feita com uma nova aprovação do comitê de ética, específica para um novo estudo.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dra Maria Cássia J. Mendes Correa e que pode ser encontrado no endereço Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470 - CEP 05403-000 - SP/São Paulo - Brasil Fone: (+55) 11 3061-7011 [e-mailmaria.cassia@hc.fm.usp.br](mailto:e-mailmaria.cassia@hc.fm.usp.br)

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar –

tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “**Desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV2 (Covid 19): aplicação no diagnóstico da infecção e em estudos soroepidemiológicos**”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (.Dra Maria Cássia J. Mendes Correa) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

----- Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante /representante legal

-----

Nome do participante/representante legal

----- Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

## 8.2 Formulário utilizado para obtenção de dados dos indivíduos

### Formulário – Projeto Vacinados IMT (180 dias)

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Gênero: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Qual vacina tomou? \_\_\_\_\_

Data da 2ª dose: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Teve COVID-19? ( ) Sim ( ) Não

Data do diagnóstico de COVID-19: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Grau da doença: ( ) Leve ( ) Moderada ( ) Grave

Se sim, como foi feito o diagnóstico?

( ) Laboratorial (RT-PCR)

( ) Clínico (apenas sintomas)

Apresenta co-morbidades? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, quais?

( ) Doença pulmonar crônica ( )

( ) Doença cardiovascular <sup>Diabetes</sup>

( ) Hipertensão ( )

( ) Uso de imunossupressores

( )

Outros: \_\_\_\_\_



## 8.4 Publicação referente ao atual estudo

REVISTA  
DO  
INSTITUTO  
DE  
MEDICINA  
TROPICAL  
DE  
SÃO PAULO  
JOURNAL OF THE SÃO PAULO  
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

## ORIGINAL ARTICLE

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946202264019>

### Generation of neutralizing antibodies against Omicron, Gamma and Delta SARS-CoV-2 variants following CoronaVac vaccination

Almir Ribeiro da Silva Jr.<sup>1,2\*</sup>, Lucy Santos Villas-Boas<sup>2\*</sup>, Tania Regina Tozetto-Mendoza<sup>1,2,3</sup>, Layla Honorato<sup>1,2</sup>, Anderson de Paula<sup>2</sup>, Steven S. Witkin<sup>1,2,4</sup>, Maria Cassia Mendes-Correa<sup>1,2,3</sup>

#### ABSTRACT

Vaccination is a fundamental tool to prevent SARS-CoV-2 infection and to limit the COVID-19 pandemic. The emergence of SARS-CoV-2 variants with multiple mutations has raised serious concerns about the ability of neutralizing antibody responses elicited by prior vaccination to effectively combat these variants. The neutralizing capacity against the Gamma, Delta and Omicron variants of sera from individuals immunized with the CoronaVac vaccine remains incompletely determined. The present study evaluated 41 health care workers at the Faculdade de Medicina of the Universidade de Sao Paulo, in Sao Paulo, Brazil, naive to previous SARS-CoV-2 infection, who were vaccinated with two doses of the CoronaVac SARS-CoV-2 vaccine 28 days apart. Neutralizing antibody levels against the Gamma, Delta, and Omicron variants were measured at 32 and 186 days after the second vaccination. We also measured neutralizing antibodies against Omicron in 34 of these individuals following a subsequent booster immunization with the Pfizer vaccine. Quantification of neutralizing antibodies was performed using the Cytopathic Effect-based Virus Neutralization test. Neutralization antibody activity against the Gamma, Delta and Omicron variants was observed in 78.0%, 65.9% and 58.5% of serum samples, respectively, obtained at a mean of 32 days after the second immunization. This decreased to 17.1%, 24.4% and 2.4% of sera having activity against Delta, Gamma and Omicron, respectively, at 186 days post-vaccination. The median neutralizing antibody titers at 32 days were 1:40, 1:20 and 1:20 against Gamma, Delta and Omicron, respectively, and decreased to an undetectable median level against all variants at the later time. A booster immunization with the Pfizer vaccine elicited neutralizing antibodies against Omicron in 85% of subjects tested 60 days

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM 52), São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

## 8.5 Publicação referente ao atual estudo

REVISTA  
DO  
INSTITUTO  
DE  
MEDICINA  
TROPICAL  
DE  
SÃO PAULO

JOURNAL OF THE SÃO PAULO  
INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

LETTER TO THE EDITOR

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946202264043>

**Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant following two CoronaVac vaccinations and a Pfizer/BioNTech mRNA vaccine booster**

Sao Paulo, May 15<sup>th</sup>, 2022

Dear Editor

In a previous study conducted by our group, we evaluated 41 subjects who were vaccinated with two doses of the CoronaVac SARS-CoV-2 vaccine, with an interval of 28 days between doses, and subsequently received a booster of the mRNA vaccine from Pfizer/BioNTech<sup>1</sup>. We determined the neutralizing capacity against the SARS CoV-2 Omicron variant 62.7 days following the administration of the booster.

In this investigation, we extended our initial findings on the same study subjects by reporting levels of neutralizing antibodies against the Omicron variant at a mean of 151.5 days after the booster vaccine.

Neutralizing antibodies against Omicron decreased in the subjects, since the first result showed a 85.3% positivity, whereas at day 151.5 ( $p = 0.0336$ ), this percentage fell to 60.5%. The virus neutralization titer (VNT) also decreased at day 151.5 post-booster as opposed to day 62.7 VNT ( $p = 0.0256$ ).

There is very limited knowledge about the activity and duration of neutralizing antibodies in vaccinated people after a two-dose vaccine schedule with an inactivated vaccine (CoronaVac) followed by a booster dose with an mRNA vaccine, as currently recommended by the Brazilian Ministry of Health<sup>2-4</sup>. To the best of our knowledge, this is the first report of anti-Omicron neutralizing antibodies in sera following a protracted period (day 151.5) post-mRNA vaccine booster. Our parallel findings from other studies suggest that vaccine effectiveness wanes over time following a booster vaccination<sup>5,6</sup>. In one study conducted during the Omicron variant outbreak in our country, vaccine effectiveness against COVID-19-associated hospitalization was 91% versus 78% among those who received the third dose of mRNA vaccine in periods equal to or less than two months in comparison with periods of more than four months after the second dose of vaccine, respectively<sup>6</sup>.

The post-vaccination sera with virus neutralization activity and the virus

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52), São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Weill Cornell Medicine, Department of

## 8.6 Apresentação de resumo em congresso



The Brazilian Journal of Infectious Diseases

Volume 26, Supplement 2, September 2022, 102448



EP-007

# DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA AS VARIANTES DELTA, GAMA E OMICRON APÓS IMUNIZAÇÃO POR CORONAVAC E BOOSTER COM PFIZER

Almir Ribeiro da Silva Jr., Lucy Santos Vilas-Boas, Anderson Vicente de Paula, Bruno Eiji Miyagui,  
Layla Honorato, Steven S. Witkin, Tania Regina Tozetto-Mendoza, Maria Cassia Mendes-Correa

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102448> ↗

[Get rights and content](#) ↗

[Under a Creative Commons license](#) ↗

open access