



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO SARS-COV-2
DE ACORDO COM A GRAVIDADE DA COVID-19 EM PACIENTES ATENDIDOS
NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO**

**Recife
2024**

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO SARS-COV-2
DE ACORDO COM A GRAVIDADE DA COVID-19 EM PACIENTES ATENDIDOS
NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Medicina
Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife
2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Oliveira, Marta Iglis de.

Avaliação da cinética de anticorpos específicos ao SARS-CoV-2 de acordo com a gravidade da COVID-19 em pacientes atendidos na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco / Marta Iglis de Oliveira. - Recife, 2024.

107f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências de Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo.

Coorientação: Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena.

Inclui referências e apêndices.

1. Anticorpos; 2. Imunidade humoral; 3. Síndrome respiratória aguda severa; 4. Sorodiagnóstico de COVID-19; 5. Vírus SARS-CoV-2. I. Araújo, Paulo Sérgio Ramos de. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO SARS-COV-2
DE ACORDO COM A GRAVIDADE DA COVID-19 EM PACIENTES ATENDIDOS
NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Medicina
Tropical.

Aprovada em: 20/09/2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Cynthia Regina Pedrosa Soares (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Juliana Prado Gonçalves (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Nada nos limitava, nada nos definia, nada nos sujeitava; nossas ligações com o mundo, nós é que as criávamos; a liberdade era nossa própria substância.

(Simone de Beauvoir)

Dedico às vítimas fatais da pandemia de COVID-19.

.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Iracema e Manoel, que me proporcionaram a oportunidade que eles não acessaram, estudar. São meus exemplos de superação, resiliência e humildade.

Aos meus irmãos, Myrtes e Marcelo, a amizade e o acolhimento, a compreensão nos momentos de ausência durante o processo de construção desta pesquisa.

A Rosana, o cuidado e o carinho diário, sempre trazendo incentivo e tranquilidade, agradeço todo o companheirismo na vida.

Aos amigos e amigas, em especial, àqueles que estiveram muito próximos nesta etapa da minha história: Katarina, Eliane e Pedro Paulo Nascimento.

À Diretoria Médica e à equipe da Clínica Médica do Centro Médico Hospitalar - PMPE, o apoio e a compreensão no desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio, a acessibilidade, disponibilidade, o carinho com que conduziu este trabalho.

Ao grupo de pesquisa COVID-19 do Departamento de Medicina Tropical-CCM-UFPE, especialmente a minha coorientadora Prof. Dra. Virginia Lorena, a Patrícia Areias e a Melayne Aciole.

À Profa. Dra Heloísa Ramos, a contribuição essencial em todas as etapas desta caminhada acadêmica, o mestrado e doutorado.

A todo o grupo da enfermaria das Doenças Infectoparasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas, Dr. Carlos Eduardo, Dra. Luciana Cardoso, Dr. Evônio Campelo, Dra Cláudia Vidal, agradeço o conhecimento e a experiência compartilhados diariamente.

À equipe ambulatorial da DIP do Hospital das Clínicas, Stephanie, Roque, Ivanilda e Celia, sem os quais, não teria sido possível a coleta de parte dos dados utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os pacientes que, generosamente, colaboraram com esta pesquisa em um dos períodos mais desafiadores da história da saúde pública da humanidade.

À minha psicóloga, que tem contribuído no meu processo de autoconhecimento e descoberta dos meus verdadeiros anseios.

RESUMO

Desde o início da pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19), tem havido um esforço contínuo para compreender a cinética de anticorpos anti-SARS-CoV-2, com atenção especial ao tempo de duração dos níveis de imunoglobulinas da classe IgG, dada sua importância na proteção de reinfecção. Duas hipóteses têm preocupado: a primeira refere-se ao declínio dos níveis séricos dos anticorpos IgG ao longo do tempo, e a segunda relaciona-se com a possibilidade de que indivíduos com COVID-19 leve tenham menor probabilidade de soroconversão ou desenvolvem resposta imune menos robusta em comparação com aqueles que apresentam uma forma grave da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a cinética de anticorpos específicos IgG-S contra o SARS-CoV-2 em pacientes não vacinados, recuperados da primeira infecção, de acordo com a gravidade da doença, e identificar os fatores associados à negativação sorológica em 386 dias após o início dos sintomas. Trata-se de um estudo prospectivo, com caráter analítico, realizado entre agosto de 2020 e junho de 2021 no ambulatório de egresso para recuperados de covid-19 em dois hospitais da cidade do Recife. A população-alvo consistiu em pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, diagnosticados com COVID-19 por RT-PCR, divididos em dois grupos: aqueles com sintomas leves e os que apresentaram sintomas graves, requerendo internação. Para a aferição da soroconversão e concentração sérica de anticorpos, foi avaliada a resposta de imunoglobulinas IgG à proteína Spike subunidade S1 (IgG-S1) por meio de kit semiquantitativo anti-SARS-CoV-2 ELISA. Analisamos 238 indivíduos recuperados de COVID-19: 87 hospitalizados e 151 não hospitalizados, fornecendo 148 e 220 amostras, respectivamente. Entre os hospitalizados, foram mais frequentes sexo masculino (65,5%), pessoas com mais de 60 anos (41,1%), comorbidades como hipertensão arterial (67,8%) e diabetes mellitus (37,9%). Encontramos maiores medianas de títulos séricos de IgG-S1 entre os recuperados de COVID-19 hospitalizados, em todos os intervalos de tempo da coleta ($p < 0,001$). Observamos uma fraca correlação entre o aumento da idade com a resposta humoral de IgG-S1 (Correlação de Spearman = 0,298). Houve maior probabilidade de persistência de anticorpo IgG-S1 ao longo do tempo entre as amostras de indivíduos hospitalizados comparadas com amostras dos participantes não hospitalizados ($p = 0,001$). Além disso, 9,2% dos indivíduos não soroconverteram. A análise mostrou uma associação da apresentação clínica leve com a não soroconversão. Em conclusão, nossos achados revelaram que a apresentação clínica grave de COVID-19 foi o principal fator de influência nos níveis séricos e na persistência de anticorpos IgG-S em COVID-19 após primo-infecção por SARs-CoV-2 em pacientes recuperados não vacinados. A COVID-19 leve foi associada a não soroconversão.

Palavras-chave: Anticorpos. Imunidade humoral. Síndrome respiratória aguda severa. Sorodiagnóstico de COVID-19. Vírus SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Since the emergence of the coronavirus disease 2019 (covid-19) pandemic, there has been a critical focus on understanding the kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibodies, particularly the duration of IgG levels, due to their established role in protecting against reinfection. Two key concerns have emerged regarding immunity to covid -19: first, the potential decline in serum levels of IgG antibodies over time, and second, the possibility that individuals with mild cases are less likely to seroconvert or develop a robust immune response compared to those with a severe form of the disease. Therefore, the aim of this study was to analyze the kinetics of specific IgG-S antibodies against SARS-CoV-2 in unvaccinated patients who recovered from the first infection, according to disease severity, and to identify factors associated with serological negativity 386 days after symptom onset. This was a prospective analytical study conducted from August 2020 to June 2021 at the post-covid -19 recovery outpatient clinics of two hospitals in the city of Recife, Brazil. The study enrolled adult participants (aged 18 years or older) with a confirmed covid -19 diagnosis by RT-PCR. Participants were divided into two groups: those with mild symptoms and those with severe symptoms who required hospitalization. To assess both seroconversion and the concentration of serum antibodies, we employed a semiquantitative anti-SARS-CoV-2 ELISA kit to measure the specific response of IgG immunoglobulins directed against the spike protein subunit S1 (IgG-S1). Two hundred and thirty-eight recovered covid -19 individuals were included in this analysis: 87 hospitalized patients (contributing 148 samples) and 151 non-hospitalized individuals (contributing 220 samples). Within the hospitalized group, males (65.5%) and those exceeding 60 years of age (41.1%) were most prevalent. Additionally, prevalent comorbidities included hypertension (67.8%) and diabetes mellitus (37.9%). Notably, hospitalized covid -19-recovered patients exhibited consistently higher median serum IgG-S1 titers across all collection time points ($p < 0.001$). Interestingly, a weak correlation (Spearman Correlation = 0.298) was observed between increasing age and the IgG-S1 humoral response. This study observed a higher likelihood of sustained IgG-S1 antibody levels over time in hospitalized patients compared to non-hospitalized participants ($p = 0.001$). Moreover, 9.2% of individuals did not seroconvert. Univariate analysis revealed an association between mild clinical presentation and non-seroconversion. In conclusion, these findings suggest that the severe presentation of covid-19 was the primary factor influencing serum levels and persistence of IgG-S antibodies following primary SARS-CoV-2 infection in unvaccinated recovered patients. In other words, mild covid-19 was associated with non-seroconversion. ($p = 0.001$).

Keywords: Anticorps. Humoral immunity. Severe acute respiratory syndrome. Covid-19 Serodiagnosis. SARS-CoV-2 virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura viral do SARS-CoV-2.....	16
Figura 2 – Estrutura da proteína Spike	17
Figura 3 – Ciclo replicativo da SARS-CoV-2	18
Figura 4 – Mecanismos de proteção: neutralizante e efector	25
Figura 5 – Modelo teórico proposto para resposta humoral de IgG-S ao SARS-CoV-2	30
Figura 6 – Triagem, inscrição e estratificação.....	39
Figura 7 – Comparação de médias de títulos séricos de anticorpo IgG-S1 em 238 indivíduos recuperados da covid-19 de acordo com a hospitalização em 386 dias após a primeira infecção por SARS-CoV-2.....	42
Figura 8 – Coeficiente de Correlação Spearman entre títulos séricos de anticorpo IgG-S1 com a idade (Spearman correlation =0,298).....	44
Figura 9 – Comparação de médias de títulos séricos de anticorpo IgG-S1 em 87 indivíduos hospitalizados recuperados de covid-19 de acordo com a demanda de oxigênio...44	
Figura 10 – Probabilidade de persistência do anticorpo IgG-S1 de acordo com a gravidade em 238 indivíduos recuperados da covid-19 em 386 dias.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e biológicas de 238 indivíduos recuperados da COVID-19 de acordo com a hospitalização em 386 dias após primeira infecção.....	41
Tabela 2 – Fatores que impactam no nível sérico de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 em amostras de indivíduos recuperados depois da primeira infecção.....	43
Tabela 3 – Modelo anticorpos IgG-S1.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2	Receptor enzima conversora de angiotensina 2
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
ADCP	Fagocitose dependente de anticorpos
anti-RBD	Anticorpo contra o domínio ligante de receptor
CEP	Comitê de ética
CMH-PMPE	Centro Médico Hospitalar da Polícia Militar de Pernambuco
COVID-19	Doença coronavírus 2019
CTD	Domínio carboxi-terminal
E	Proteína envelope
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fab	Região variável do anticorpo
Fc	Região constante do anticorpo
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCoV	Coronavírus que provoca doença em humanos
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
Ig	Imunoglobulina ou anticorpo
IgG-S	Anticorpo anti-spike
LACEN-PE	Laboratório Central de Pernambuco
M	Proteína matriz
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
N	Proteína nucleocapsídeo
NAbs	Anticorpos neutralizantes
NK	Natural Killer
NTD	Domínio amino-terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde
RBD	Domínio ligante de receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de cadeia polimerase-transcriptase reversa
S	Proteína Spike
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave

SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
T2DM	Diabetes Mellitus tipo 2
UTI	Unidade de terapia de intensiva
VMI	Ventilação mecânica invasiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 HISTÓRICO	14
2.2 ESTRUTURA VIRAL	15
2.3 RESPOSTA IMUNE AO VÍRUS SARS-CoV-2	18
2.3.1 Resposta imune inata na infecção por SARS-CoV-2	18
2.3.2 Resposta imune adaptativa na infecção por SARS-CoV-2	18
2.3.2.1 Resposta celular na infecção por SARS-CoV-2	19
2.3.2.2 Resposta humoral na infecção por SARS-CoV-2	20
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA COVID-19.....	27
2.4.1 Fase aguda	27
2.4.2 COVID-19 longa	29
3 HIPÓTESE E MODELO TEÓRICO	30
3.1 HIPÓTESE	30
3.2 MODELO TEÓRICO.....	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GERAL.....	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5 METODOLOGIA.....	32
5.1 DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E PERÍODO	32
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	32
5.2.1 Critérios de inclusão	32
5.2.2 Critérios de exclusão	32
5.3 AMOSTRA.....	33
5.3.1 Tipo de amostragem	33
5.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	33
5.5 DEFINIÇÃO DE TERMOS E CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS.....	35
5.5.1 Definição de termos.....	35
5.5.2 Variáveis.....	35
6 RESULTADOS	36
6.1 – ARTIGO ORIGINAL 1.....	36

6.2 ARTIGO ORIGINAL 2.....	52
CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	69
APÊNDICE B – Ficha de coleta	71
APÊNDICE C – Versão do artigo 1 em inglês.....	73
APÊNDICE D – Versão do artigo 2 enviado para publicação em inglês	92

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do surto da doença causada pelo coronavírus 2019 (COVID-19), esforços contínuos têm sido feitos para compreender a cinética de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Especial atenção tem sido dada a duração dos níveis de imunoglobulina (Ig) da classe IgG devido sua importância na proteção contra reinfecção (Long et al., 2020; Lumley et al., 2020; Gallais et al., 2021). Duas hipóteses têm preocupado: a primeira refere-se ao declínio dos níveis séricos dos anticorpos IgG ao longo do tempo (Seow et al., 2020; COVID-19 Community Research Partnership Study Group, 2021) e a segunda relacionada com a possibilidade de que indivíduos com COVID-19 leve tenham menor probabilidade de soroconversão ou desenvolvam resposta imune menos robusta em comparação com aqueles que apresentam uma forma grave da doença (Long et al., 2020; Kowitdamrong et al., 2020).

Os primeiros estudos sugeriram um declínio rápido dos anticorpos IgG anti-Spike (IgG-S) em um período de três a seis meses após a infecção (Figueiredo-Campos et al., 2020; Gaebler et al.; Dan et al., 2021). Dados posteriores mostraram persistência de anticorpos IgG-S por até oito meses em indivíduos não hospitalizados (Sherina et al., 2021; Tian et al., 2021b). Uma coorte prospectiva com seguimento de 13 meses evidenciou queda significativa nos níveis séricos de anticorpos IgG-S, mais rápida no sexo masculino (Gallais et al., 2021). Neste estudo não foi possível verificar associação com a gravidade da doença, visto que apenas 4% dos indivíduos necessitaram de hospitalização.

Uma avaliação da permanência sérica dessas moléculas em indivíduos que contraíram a doença sugeriu que há dois tipos distintos de anticorpos anti-SARS-CoV-2: aqueles anticorpos com meia-vida de aproximadamente seis meses e aqueles com meia-vida de até 14 meses (Rosati et al., 2021). Os estudos sobre resposta humoral em pacientes com COVID-19 grave, na maioria, evidenciaram associação da gravidade da doença com altos títulos de anticorpos (Ren et al., 2020; Roltgen et al., 2020; Imai et al., 2021). No entanto, devido ao curto período de seguimento desses trabalhos, os autores não puderam avaliar o impacto da gravidade da COVID-19 na persistência do anticorpo IgG além 120 dias.

Pelo exposto, o objetivo deste estudo prospectivo foi comparar níveis séricos e longevidade do anticorpo IgG-S entre indivíduos que tiveram COVID-19 grave e leve, além de identificar fatores clínicos e biológicos associados à dinâmica de anticorpos IgG-S, em indivíduos recuperados de COVID-19, não vacinados, durante um período de seguimento de 386 dias após o início dos sintomas da primeira infecção por SARS-CoV-2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Há sete coronavírus que provocam doença em humanos (HCoV), dos quais, quatro são responsáveis por sintomas respiratórios leves: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV-HKU. Os outros três são SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2, responsáveis por síndrome respiratória aguda grave (Woo et al., 2009). Em 1966, encontrou-se o primeiro coronavírus, o HCoV-229E, em uma alpaca na Califórnia (Crossley et al, 2012). Em seguida, em 1967, o HCoV-OC43 foi identificado em pacientes com resfriado leve (Su et al., 2016).

Em novembro de 2002, por meio do primeiro surto de pneumonia grave por um coronavírus, emergiu o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), batizado dessa forma pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2003, sendo o surto controlado. Antes do surto epidêmico de SARS, o vírus dos morcegos infectou civetas, evoluiu e adaptou-se para infectar humanos. O SARS-CoV humano, portanto, parece ser um vírus zoonótico que atravessa a barreira do hospedeiro intermediário para infectar seres humanos (Guan, 2003).

Ainda em 2003, pesquisadores descreveram o HCoV-NL63 em uma criança de sete meses de idade, que apresentava febre, conjuntivite e coriza (Esper et al., 2005). O ancestral de HCoV-229E e HCoV-NL63 foi encontrado em morcegos africanos, e os camelídeos podem ser o hospedeiro intermediário do HCoV-229E (Van Der Hoek et al., 2004).

O HCoV-HKU foi descoberto em 2004 na Universidade de Hong Kong em um paciente com sintomas leves, e não há sequência específica de nenhum outro membro da mesma espécie (Hu et al., 2017). HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 podem ser originados de roedores. Sete anos depois, houve um surto no Oriente Médio causado por um novo coronavírus denominado Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Sua origem, possivelmente, relaciona-se com morcegos, e sua disseminação para camelos, principalmente camelos dromedários, remonta há cerca de 30 anos (Muller et al., 2014).

Em 2018, identificou-se um novo coronavírus em amostras nasais de pacientes diagnosticados com pneumonia, os quais receberam tratamento em um hospital localizado no leste da Malásia. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo nomearam esse vírus como CCoV-HuPn-2018. Ele apresenta características genéticas que sugerem a possibilidade de transmissão do cão para seres humanos (Vlasova et al., 2022).

Em 31 de dezembro de 2019, a OMS recebeu informações sobre múltiplos casos de uma condição respiratória na cidade de Wuhan, província de Hubei na China. Uma semana depois,

em 7 de janeiro de 2020, as autoridades chinesas confirmaram a identificação de um novo vírus, denominado temporariamente 2019-nCoV. Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou que o surto do novo coronavírus constituía uma Emergência de Saúde Pública Internacional e o designou oficialmente como SARS-CoV-2. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi classificada pela OMS como uma pandemia (WHO, 2020).

Análises genômicas mostraram que o coronavírus encontrado em pangolins malaio compartilha alta similaridade de sequência com o SARS-CoV-2, sugerindo que os pangolins malaio podem ser considerados um possível hospedeiro intermediário (Lam et al., 2020). O morcego é reconhecido como principal reservatório de coronavírus, com mais de 400 novas cepas, isoladas apenas pela Aliança de Saúde Ecológica da China. Os humanos são os hospedeiros finais da transmissão da doença (Olival et al., 2015). A evolução dos HCoV tem sido atribuída a um alto nível de urbanização e criação de aves, o que facilita a troca de espécies e simplifica o cruzamento de barreiras de espécies, bem como a reorganização genômica desses vírus (Jones et al., 2013).

Desde 2020, o SARS-CoV-2 tem mostrado elevada transmissibilidade e variabilidade genética. Embora sua taxa de letalidade seja comparativamente menor em relação a outros vírus respiratórios, estima-se que tenha causado cerca de sete milhões de óbitos por sua rápida disseminação global (WHO, 2024). Cientistas, em todo o mundo, dedicaram esforços consideráveis para investigar e compreender a imunopatogenicidade do SARS-CoV-2. Em um tempo recorde, foram capazes de desenvolver uma vacina segura, eficaz na redução de casos graves e na mortalidade associada à doença (Polack et al., 2020). Em 5 de maio de 2023, a OMS declarou fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional. Apesar disso, o vírus continua a se propagar e a sofrer mutações, resultando na geração de outras variantes de interesse.

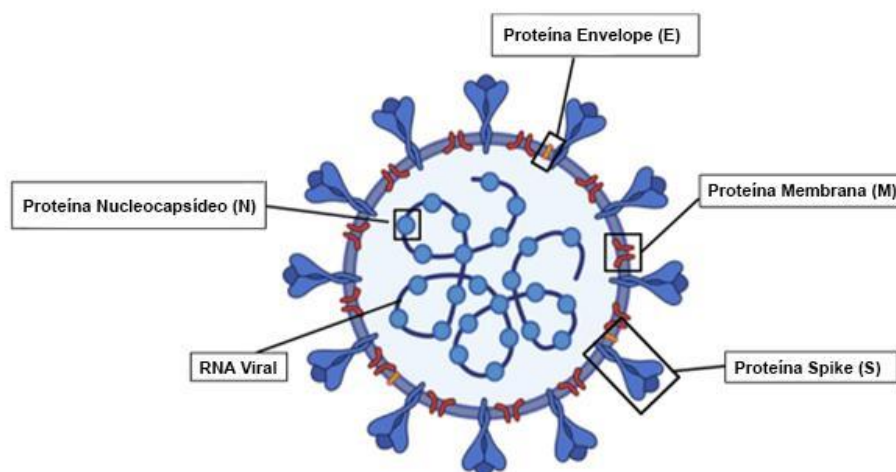
2.2 ESTRUTURA VIRAL

O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples de sentido positivo, pleomórfico, envelopado, cujo tamanho do genoma é aproximadamente 30.000 bases. É um betacoronavírus da ordem Nidovirales da família Coronaviridae. Alfa e betacoronavírus infectam mamíferos, incluindo humanos, enquanto Gamma e deltacoronavírus infectam pássaros (Woo et al., 2009).

SARS-CoV-2 mostra-se com sequência de nucleotídeos idêntica em 79% ao SARS-CoV e em 51,8% ao MERS-CoV (REN et al., 2020). Esses três coronavírus têm quatro

proteínas estruturais: proteína spike (S), proteína do nucleocapsídeo (N), membrana “matriz” (M) proteína e envelope (E) proteínas. No entanto, diferentes combinações dessas proteínas no vírion infeccioso leva a toxicidade e infecciosidade distintas (Kang et al., 2020; Rey; Lok, 2018) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura viral do SARS-CoV-2

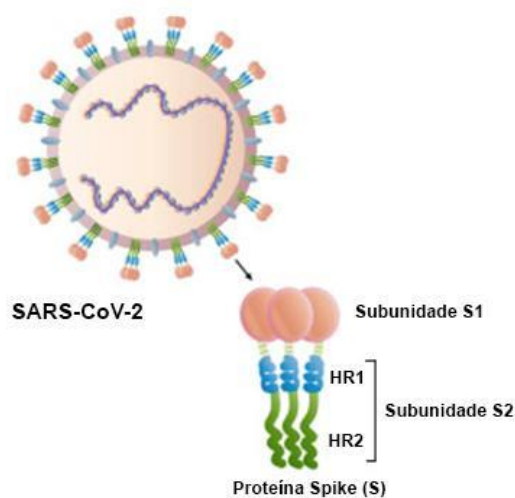


Fonte: Adaptada de Cheryl Yi-Pin Lee et al (2020).

A proteína S é uma glicoproteína trimérica classe I TM, presente em todos os coronavírus, com duas subunidades funcionais: a subunidade S1 e a subunidade S2. A subunidade S1 contém um recurso de ligação ao receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) da célula do hospedeiro para iniciar a entrada na célula. Dobra-se em quatro principais domínios estruturais: domínio amino-terminal (NTD), o domínio ligante de receptor (RDB) e dois domínios carboxi-terminais (CTDs). O domínio RDB é a região mais variável do genoma do coronavírus (Huang et al., 2020).

A subunidade S2 contém o domínio HR, incluindo HR1 e HR2, a estrutura necessária para o vírus fundir-se com a membrana da célula hospedeira (Figura 2). O domínio de fusão é uma região compartilhada entre os coronavírus e contém um peptídeo de fusão hidrofóbico, reunindo as duas bicamadas lipídicas para que a fusão ocorra (Zhang et al., 2020).

Figura 2 – Estrutura da proteína Spike



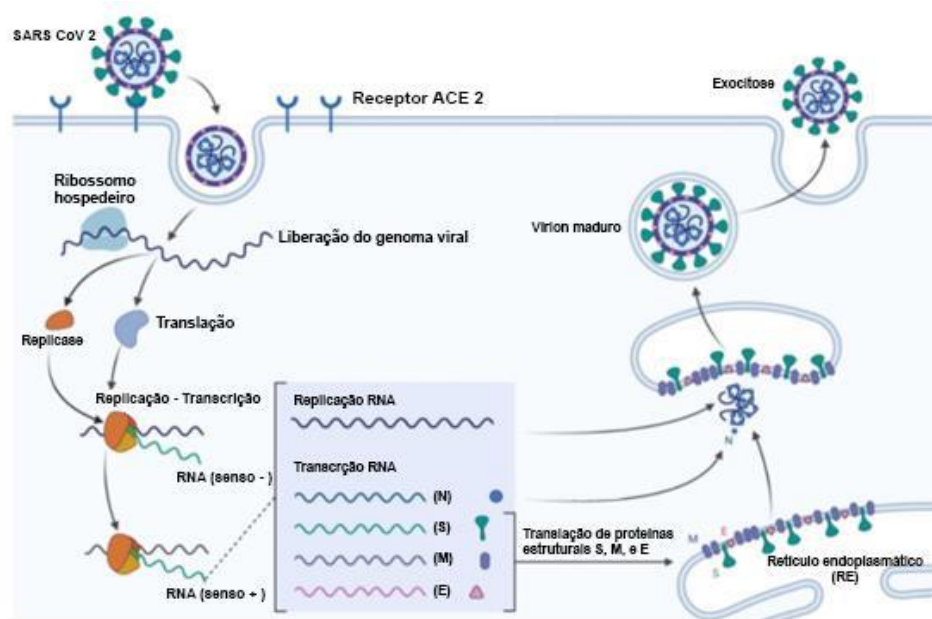
Fonte: Adaptada de Huang et al. (2020).

Ao entrar na célula, a proteína N, presente no nucleocapsídeo, protege o genoma viral, que se desprende para ser traduzido diretamente pelos ribossomos da célula do hospedeiro. Os vírus não produzem seus lipídios e utilizam os lipídios do hospedeiro para sua replicação e morfogênese. A proteína N está envolvida, portanto, com o empacotamento do genoma em partículas virais. A proteína M é a mais numerosa no vírion. Participa da determinação do sítio de brotamento do vírus, atua na montagem das partículas e interage com o nucleocapsídeo. Já a proteína E, facilita a montagem e a liberação de novos vírus, podendo causar apoptose (Zhang et al., 2020).

O ciclo de replicação da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira pode ser dividida nas seguintes etapas: fixação e entrada na célula, transcrição da replicase viral, transcrição e replicação genômica, tradução de estruturas das proteínas, e montagem e liberação de vírions, Figura 3 (Zhang et al., 2020).

O receptor ACE-2 liga-se ao RBD da proteína S, permitindo a fusão com a membrana da célula hospedeira. O RNA fita simples sentido positivo é liberado, parcialmente traduzido em proteína polimerase SARS-CoV-2 e transcrito. As resultantes proteínas translacionais S, M e E de RNA subgenômico são levadas à membrana ER celular do hospedeiro e posteriormente combinada com proteína do nucleocapsídeo. Após o processamento do Golgi, todos os elementos são incorporados a um vírion e transportado para a membrana celular para exocitose de novas partículas de SARS-CoV-2 (Wrapp et al., 2020).

Figura 3 – Ciclo replicativo da SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Cascella et al. (2020).

2.3 RESPOSTA IMUNE AO VÍRUS SARS-COV-2

2.3.1 Resposta imune inata na infecção por SARS-CoV-2

A magnitude da carga viral inicial e a eficácia da resposta imune inata, especialmente aquela mediada por interferons tipo I, parecem desempenhar um papel crucial na resposta adaptativa subsequente e no desfecho clínico (Hadjadj et al., 2020). De fato, tanto os fatores genéticos quanto os fatores adquiridos, demonstraram claramente a importância dos interferons na infecção aguda (Zhang et al., 2020).

2.3.2 Resposta imune adaptativa na infecção por SARS-CoV-2

As respostas imunes inatas e adaptativas são interconectadas e atuam em conjunto. O sistema adaptativo é composto por células B, produtoras de anticorpos, por células T CD4 T com vários mecanismos adjuvantes e efetores, e por celular T CD8+ com potencial citotóxico (Silva et al., 2022).

2.3.2.1 Resposta celular na infecção por SARS-CoV-2

A resposta adaptativa é capaz de produzir memória imunológica e controlar a infecção por SARS-CoV-2 (Grifoni et al., 2020). Assim, é crucial entendê-la no contexto da COVID-19. Na infecção por SARS-CoV-2, demonstrou-se que o desenvolvimento precoce de uma resposta de células T CD8+ citotóxicas, dentro de 7 dias após os sintomas e com pico em 14 dias, está correlacionado com a depuração viral efetiva e doença leve (Bergamaschi et al., 2021). Na doença aguda grave, observou-se uma linfopenia profunda no sangue periférico. Isso leva a um padrão de supressão e ativação coexistentes, com perda periférica de até 80% de células T, concomitantemente com intensa proliferação de, aproximadamente, 20% do conjunto de células T CD8+. Embora a linfopenia ocorra em outras infecções, na COVID-19, ela é mais rápida, profunda e duradoura (Laing et al., 2020).

O controle viral eficaz na infecção por SARS-CoV-2 associa-se a um fenótipo CD4+ tipo 1 e a altos níveis de expressão de moléculas efetoras pelas células T CD8+. O fenótipo CD4+ tipo 2 e níveis excessivamente elevados de ativação de células T associam-se a resultados clínicos desfavoráveis (Mathew et al., 2020). Achados *post-mortem* de infiltração linfocítica no tecido sugerem que a célula T específica do vírus contribui para o dano tecidual (Schaller et al., 2020).

A resposta das células T CD4+ e CD8+ está altamente correlacionada com quase todas as proteínas, com foco na proteína S, cuja magnitude se correlacionou com o nível de expressão protéica de cada gene. A imunidade robusta é certamente mantida por além de seis meses (Jung et al., 2021). Há evidência de alguma reorientação da especificidade das células T ao longo do tempo e uma meia-vida estimada em cerca de 200 dias para células específicas do vírus (Cohen et al., 2021). Espera-se que células T sejam mantidas durante muitos anos, embora isso possa depender da gravidade clínica da infecção inicial (Wheatley et al., 2021). Células T de memória foram identificadas nos pulmões aproximadamente 10 meses depois da infecção, e se relacionam com a proteção, reduzindo a gravidade da doença na reinfecção (Grau-Exposito et al., 2021).

Observou-se uma reação cruzada com células T específicas ao HCoV. Há uma hipótese de que células T específicas ao HCoV possam promover uma imunidade celular mais robusta após a exposição ao SARS-CoV-2, o que poderia estar associada a melhores resultados clínicos (Sagar et al., 2021). Há argumentos, no entanto, contra essa hipótese de imunidade cruzada protetora, uma vez que células T específicas para o HCoV, frequentemente, apresentam baixa avides contra os peptídeos do SARS-CoV-2 (Dykema et al., 2021).

Respostas de células T com reatividade cruzada também são observadas em crianças. A influência da idade na imunidade adaptativa de reação cruzada não está clara, mas pode estar relacionada com a intensa ativação imunológica de infecções primárias por HCoV em crianças (Dowell et al., 2022). Outra possibilidade é que as crianças podem ser programadas evolutivamente para desenvolver respostas imunitárias de reação cruzada de forma mais acentuada, como observado anteriormente no contexto de reforço da imunidade à gripe (Meade et al., 2020).

Dessa forma, uma vez estabelecida a infecção, a resposta imune adaptativa é crucial para a eliminação viral. Os anticorpos têm um papel crítico na neutralização viral, mas evidências indicam que o vírus pode espalhar-se por meio do contato célula a célula, resistindo à neutralização dos anticorpos (Zeng et al., 2022). Esse mecanismo, observado em diversos outros vírus, sugere que a imunidade das células T pode ser essencial para eliminar o SARS-CoV-2 (Igakura et al., 2003).

2.3.2.2 Resposta humoral na infecção por SARS-CoV-2

A resposta imune humoral à infecção viral ou a vacinas pode ser dividida didaticamente em duas fases: fase extrafolicular e fase do centro germinativo. Na fase extrafolicular, após alguns dias da infecção, as células B são ativadas e se diferenciam em células plasmáticas que contêm poucas hipermutações somáticas e curto tempo de vida. Podem apresentar, no entanto, alta afinidade e ser capaz de neutralizar o vírus (Lam et al., 2020). A fase do centro germinativo começa cerca de uma semana após a infecção e pode durar meses. Nessa fase, as células B antígeno-específicas sofrem hipermutação somática e seleção baseada em afinidade, cujo resultado são células plasmáticas de alta afinidade, comutada por isotipo, que estabelecem compartimento de vida longa na medula óssea (Palm et al., 2019).

Resposta de anticorpos séricos na infecção por SARS-CoV-2

Os anticorpos desempenham um papel crucial na proteção contra doenças virais, envolvendo sua região variável (Fab), que media a neutralização, e sua região constante (Fc), que participa ativando complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e fagocitose dependente de anticorpos (ADCP) (Kreer et al., 2020).

Em apenas uma semana depois do início dos sintomas, é possível identificar anticorpos séricos, de provável origem na fase extrafolicular (Woodruff et al., 2020). Quase todas as pessoas com infecção por SARS-CoV-2 soroconvertem duas semanas após o início dos

sintomas, produzindo anticorpos IgM, IgA e IgG, que reconhecem predominantemente a proteína S e a proteína N (Long et al., 2020).

Uma coorte de 65 pacientes, seguida por 94 dias, constatou um tempo médio para soroconversão de 12,5 dias após o início dos sintomas. A frequência de indivíduos que geraram resposta IgM foi 92,3%, 92,3% e 95,4% de soropositividade para S, RBD e N respectivamente (Seow et al., 2020).

O nível sérico de IgM, em resposta aos antígenos S, RBD e N, atinge o pico em 20 dias após o início dos sintomas e depois declina, retornando para a linha de base após 60 dias. Geralmente, não é mais detectado após dois meses (Seow; Gudbjartsson et al., 2020). Wu e colaboradores (2021) encontraram diferença na dinâmica de IgM-S e IgM-N em uma coorte de 349 pacientes. Os títulos de IgM-S atingiram seu pico na quarta semana após o início dos sintomas; em seguida, diminuíram lentamente e tornou-se indetectável na décima segunda semana. Já o IgM-N, chegou a pico na terceira semana, e declinou rapidamente, abaixo do valor de coorte depois da nona semana.

O IgA específico é um dos primeiros a aparecer nas primeiras semanas da infecção, inclusive podendo aparecer antes do isotipo IgM no sangue. Uma hipótese que justificaria esse fenômeno seria a existência de imunidade prévia a outros coronavírus sazonais (STERLIN et al., 2021).

Já a resposta de anticorpos IgG sérico, é mais duradoura. No primeiro ano da pandemia de COVID-19, a longevidade de anticorpos IgG, em resposta a todos os três antígenos S, RBD e N, não estava estabelecida e foi alvo de vários estudos com achados divergentes.

SEOW e colaboradores (2020) constataram, após seguir 65 indivíduos, a persistência de IgG-S, IgG-RDB e IgG-N por 94 dias. No estudo de WU e colaboradores (2020), uma coorte com 349 pacientes sintomáticos, os títulos de IgG-N e IgG-S atingiram seus picos na semana quatro e cinco respectivamente. A partir da semana seis, os títulos diminuíram constantemente até a semana 14, estabilizando em níveis elevados até o fim do período de observação de 26 semanas.

Com o passar do tempo, foi possível constatar que há um declínio na taxa de soropositividade, mas há persistência em níveis elevados. A análise de amostras de 531 indivíduos recuperados da infecção de SARS-CoV-2, confirmados por reação de cadeia polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR), encontrou que a taxa de soropositividade, 12 meses após o início dos sintomas, foi de 68,6% para anti-IgG-S1 e 77,1% para anti-RBD (Chansaenroj et al., 2022).

Fatores que impactam a dinâmica dos anticorpos anti-SARS-CoV-2

Evidências disponíveis sugerem fortemente que a gravidade dos sintomas de COVID-19 associa-se à magnitude da resposta humoral. Anticorpos totais e IgG alcançaram níveis séricos mais elevados em pacientes com sinais e sintomas mais severos (Gudbjartsson; Sun; Seow et al., 2020).

Há dados que suportam a ideia de que o grau de declínio nos níveis séricos de anticorpos ao longo do tempo depende da criticidade dos sintomas. Dessa forma, indivíduos com títulos elevados de anticorpos IgG apresentaram uma persistência mais longa de anticorpos específico-SARS-CoV-2 comparados com aqueles de títulos mais baixos (Chansaenroj et al., 2022). O anticorpo IgG-S persiste ao longo de mais de 12 meses, enquanto IgG anti-N atinge seu pico com três meses e desaparece após seis meses, mesmo na COVID-19 grave. Uma hipótese para a associação entre severidade do quadro clínico e resposta de anticorpos é o escape viral e maior capacidade de replicação, gerando grande descarga antigênica e, consequentemente, uma forte resposta de anticorpos (Chansaenroj et al., 2022).

Não ter sintomas ou ter poucos sintomas é o mais consistente fator associado a não soroconversão (Johannesen et al., 2021). Uma coorte prospectiva com 74 participantes infectados pelo SARS-CoV-2, sendo metade dos indivíduos assintomáticos, demonstrou que 40% dos indivíduos assintomáticos foram soronegativos (Long et al., 2020). Posteriormente, estudos mais robustos demonstraram que 1% a 8% dos pacientes convalescentes não desenvolveram anticorpos ou tiveram uma resposta indetectável (L'huillier et al., 2021). Mesmo esses indivíduos tendo falhado na soroconversão depois da infecção, podem ainda ter uma robusta resposta humoral com a reexposição ao antígeno em razão da memória imune (Lustig et al., 2022).

A idade é descrita como fator preditor para a COVID-19 grave. A imunossenescência promove mudanças quantitativas nas células e componentes do sistema imune, bem como mudanças mais complexas na ação em diversas respostas imunes. O idoso tem sua capacidade comprometida de responder efetivamente a novos antígenos, além da inflamação crônica de baixo grau impulsionada por um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda e estressores oxidativos (Aiello et al., 2019).

Os resultados de alguns estudos são conflitantes ao analisar se há correlação entre resposta humoral e idade. Alguns pesquisadores encontram uma correlação positiva entre níveis de anticorpos e idade (klein et al., 2020; Zhai et al., 2022). É possível que pessoas mais jovens desenvolvam maior controle viral, menor descarga antigênica e, assim, menor concentração de anticorpos. Outra pesquisa com participantes recuperados de COVID-19 com sintomas leves a

moderados não encontrou correlação entre idade e concentração de anticorpos (Li et al., 2020). Uma possível explicação para achados distintos entre os estudos seria a diferença entre as populações dos estudos quanto à gravidade da COVID-19.

O sexo masculino tem sido descrito como de maior risco para hospitalização, necessidade de cuidados intensivos e morte na infecção por SARS-CoV-2, comparado com o sexo feminino. Esse desfecho relaciona-se com diferenças entre ambos os sexos na resposta imune, diferenças hormonais e genéticas, e ocorrem também em outras infecções (Pijls et al., 2022).

Observou-se uma robusta ativação de células T, especialmente células T CD8+, e resposta Interferon após ativação TLR7 em pessoas do sexo feminino (Alwani et al., 2021). Além disso, a testosterona pode aumentar a expressão de ACE2 facilitando a entrada do vírus na célula do hospedeiro. Por outro lado, níveis mais elevados de estrogênio inibem a resposta imune inata pró-inflamatória, melhoram a resposta imunológica T-helper-2 e humoral, e exercem efeitos protetores na função das células endoteliais (Giagulli et al., 2021). Por fim, a presença do cromossomo X codifica vários genes envolvidos na função imune inata e adaptativa, resultando em maior plasticidade na resposta imune nas mulheres (Scutrz et al., 2019). Assim, o sexo masculino, por desenvolver com mais frequência a COVID-19 grave, pode apresentar títulos mais elevados de IgG, refletindo uma doença mais severa (Klein et al., 2020).

A obesidade é outro fator que influencia na gravidade da COVID-19, uma vez que o tecido adiposo aumenta a expressão de ACE2 e pode servir de reservatório viral para SARS-CoV-2, como ocorre com o vírus da imunodeficiência adquirida, citomegalovírus, adenovírus Ad-36, Influenza A (El-Sayed Moustafa et al., 2022).

Resultados contraditórios, no entanto, têm sido publicados relacionando o impacto da obesidade e o sobrepeso com a resposta imune. Inicialmente, foram relatados títulos menores de anticorpo anti-IgG-S em indivíduos obesos, e índice de massa corpórea negativamente associado aos níveis séricos de anticorpo IgG-S na COVID-19 (Frasca et al., 2021). Posteriormente, em um estudo mais robusto, verificou-se que a resposta humoral e celular foram mais fortes em pessoas com sobrepeso e obesas comparadas com pessoas de peso normal. Os títulos de IgG específicos e anticorpos neutralizantes (NAbs) foram significativamente maiores em pacientes com sobrepeso comparando pacientes com peso normal até seis meses, e em pacientes obesos comparados com pacientes de peso normal até 12 meses (Onyango et al., 2023).

Desde o início da primeira onda de COVID-19, rapidamente observou-se a associação de diabetes com excesso de risco para pneumonia grave por SARS-CoV-2 (Huang et al., 2020). Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) têm a resposta proliferativa de linfócitos prejudicada, bem como uma disfunção de monócitos, macrófagos, neutrófilos e na ativação do complemento. A hiperglicemia funcionaria como um fator negativo agindo como um regulador da imunidade inata (Daryabor et al., 2020).

Contudo, a resposta humoral na infecção por SARS-CoV-2 em pessoas com T2DM não é prejudicada. Foi documentada uma resposta quantitativa maior de anti-RBD IgG em três semanas após o início dos sintomas e um declínio precoce de IgM em 3 semanas em pessoas diabéticas comparadas com as sem diabetes. Especula-se que essa diferença seja decorrente de maior estado inflamatório em pacientes com T2DM, gerando uma maturação precoce da resposta de anticorpos (Lampasona et al., 2020).

Outra condição que interfere na resposta humoral é o contato prévio com coronavírus sazonal. Constatou-se que imunidade pré-existente a um coronavírus sazonal conduz à geração de respostas do tipo memória ao SARS-COV-2, porém não conduz à proteção cruzada contra a COVID-19. Documentou-se, também, a capacidade de gerar IgG anti-SARS-CoV-2 antes de IgM (Miyara et al., 2022).

Resposta de anticorpos de mucosa na infecção por SARS-CoV-2

Anticorpos de mucosa, em particular IgA, secretória dimérica na via respiratória, pode contribuir na prevenção da transmissão de SARS-CoV-2. Durante a primeira onda pandêmica, observou-se que maiores níveis de anticorpos anti-RBD e anti-S específico na mucosa nasal foram associados a menor carga viral e à resolução de sintomas sistêmicos, uma vez que o controle do vírus nas vias aéreas superiores reduz a disseminação do vírus para a periferia. Permaneceram elevados até o fim do seguimento, nove meses (Froberg et al., 2021).

Surpreendentemente, alguns profissionais de saúde com títulos negativos de anticorpos séricos evidenciaram IgA específica para SARS-CoV-2 com capacidade de neutralização em fluidos de mucosa nasal, sugerindo o papel protetor dos anticorpos de mucosa (Cervia et al., 2021).

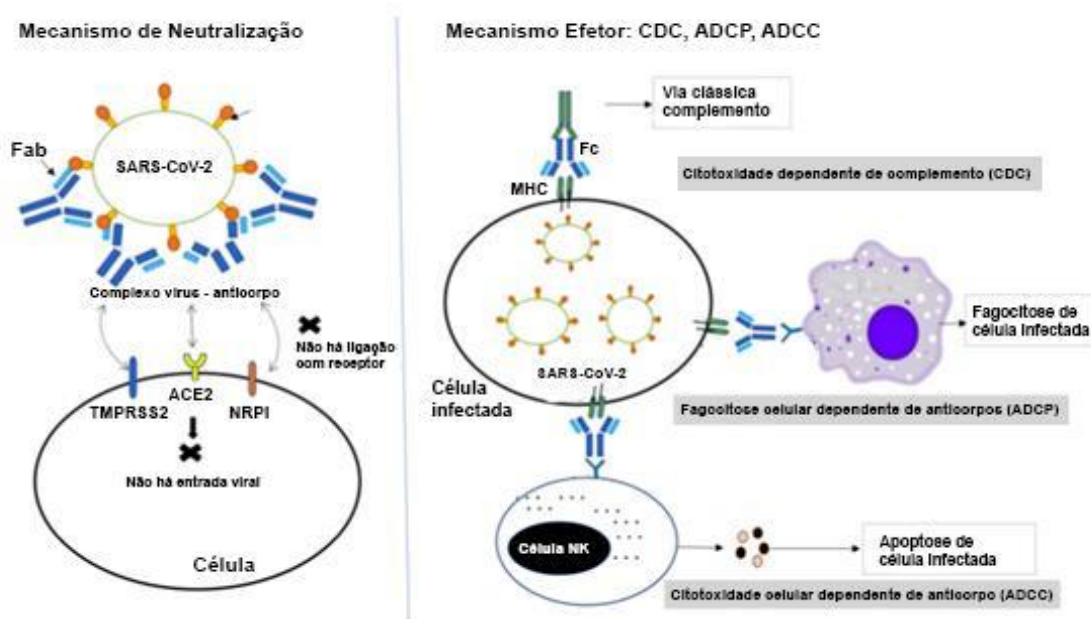
Outro estudo que avaliou a frequência de células secretoras de anticorpos constatou a expansão periférica de plasmablastos IgA com potencial de direcionamento à mucosa logo após o início dos sintomas e atingiu o pico durante a terceira semana da doença. Detectaram-se títulos mais elevados de IgA específica para SARS-CoV-2 na saliva em relação às amostras dos pares

no soro obtidas após 49 dias do início dos sintomas, sugerindo que a forma dimérica da IgA é mais potente do que os monômeros IgA (Sterlin et al., 2021).

Mecanismos de proteção e resposta de anticorpos neutralizantes na infecção por SARS-CoV-2

Os anticorpos que reconhecem patógenos podem ser categorizados como anticorpos não-neutralizantes ou NAbs. Estes têm a capacidade de bloquear a invasão celular ou inibir a fusão da membrana após o reconhecimento do patógeno (MOOG et al., 2014). Na infecção por SARS-CoV-2, os anticorpos com atividade neutralizante atuam bloqueando a ligação da proteína S ao seu receptor ACE2, além de mimetizarem o ACE2 para induzir a conversão prematura para a conformação pós-fusão (Ge et al., 2021) (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismos de proteção: neutralizante e efector



Fonte: Adaptado de ABEBE e DEJENIE, 2023.

Além do mecanismo neutralizante, há mecanismos efetores, em que as células do hospedeiro infectadas se ligam a anticorpos, via complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e Fc, ao FcγR das células imunes; e complementos desencadeiam vários mecanismos efetores para matar as células infectadas pelo vírus. Na via CDC, o complemento ativa a via clássica do complemento e induz à morte celular pela formação do complexo de ataque à membrana. Por outro lado, os fagócitos interagem com o MHC e resultam na fagocitose das

células infectadas via ADCP. Da mesma forma, a interação de células Natural killer (NK) que expressam FcγR com o Fc do complexo de anticorpos leva à liberação de grânulos citotóxicos e, portanto, à citólise (via ADCC) (Schäfer, 2021) (Figura 4).

Diversas linhas de evidência têm estabelecido títulos de NAbs como um melhor fator de correlação com a proteção, que é uma métrica imunológica usada para avaliar a eficácia da vacina contra Infecção por SARS-CoV-2 (Gilbert et al., 2022).

A maioria dos pacientes que soroconvertem produz respostas detectáveis de NAbs. Os títulos de ligação IgG-S correlacionam-se significativamente com a neutralização do vírus e age como um excelente preditor de neutralização (Tian et al., 2021b). Os NAbs também demonstram uma correlação positiva com os níveis de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas, incluindo fator celular, o ligante indutor de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral e o fator estimulador de colônias de macrófagos (Wang et al., 2021).

O anticorpo isotipo IgA-RBD específico tem contribuído fortemente para a neutralização do vírus na fase precoce da infecção (Sterlin et al., 2021). Entre sete e 15 dias após o início dos sintomas, é possível detectar atividade neutralizante dos anticorpos, porém os níveis de neutralização variam bastante entre os indivíduos (Robbiani et al., 2020). Os NAbs IgA atingem o pico entre 15 e 30 dias e desaparecem depois de 50 dias após o início dos sintomas. Isso explica parcialmente por que a terapia plasmática nem sempre produziu resultados com impacto na mortalidade (Recovery Group, 2021).

Os níveis séricos de NAbs IgG contra SARS-CoV-2 atingem o pico em quatro a seis semanas após a infecção e diminuem posteriormente. Títulos neutralizantes contra SARS-CoV-2 em indivíduos recuperados da COVID-19 foram detectados em 95,2%, 86,7%, 85,0% e 85,4% em três, seis, nove e doze meses após o início dos sintomas respectivamente (Chansaenroj et al., 2022).

O domínio RBD é o principal alvo dos NAbs, seguido do domínio NTD. Ambos, localizados na subunidade S1, apresentam alto grau de variabilidade entre as cepas do SARS-CoV-2. Assim, na cepa Omicron, 15 das 35 mutações na proteína S comparada com a cepa inicial encontrada em Wuhan, China, estão localizadas no domínio RBD e oito mutações no domínio NTD. Os anticorpos que se ligam a subunidade S2 são pouco neutralizantes (McCallum et al., 2022).

O papel dos anticorpos na proteção contra a reinfecção por SARS-CoV-2

A presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 não garante proteção. Demonstrou-se que reinfecções podem ocorrer durante a fase de convalescença (Zhang et al., 2021). A proteção de um indivíduo contra a reinfecção por SARS-CoV-2 depende da quantidade e da qualidade dos anticorpos produzidos. Existe uma forte correlação entre o nível de neutralização e a defesa imunológica contra o SARS-CoV-2, com níveis mais elevados indicando anticorpos e proteção de maior qualidade (McDade et al., 2021).

Anticorpos neutralizantes em quantidade suficiente em pessoas recuperadas da infecção por SARS-CoV-2 são protetores. Tem-se estimado uma proteção de reinfecção 89% entre os soropositivos em seis meses após primo-infecção (Lumley et al., 2020). No entanto, respostas humorais após a primeira onda mostraram uma diminuição gradual inevitável em pacientes convalescentes, aumentando risco de reinfecção. Notavelmente, respostas imunes mediadas por anticorpos abaixo do ideal foram observadas de forma proeminente em indivíduos mais velhos ou imunocomprometidos recuperados da COVID-19, tornando-os mais susceptíveis a reinfecção (McDade et al., 2021).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA COVID-19

2.4.1 Fase aguda

Sabe-se que o espectro de apresentação dos sinais e sintomas é amplo, variando de pessoas assintomáticas à síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Um estudo chinês relatou cerca de 72 mil casos, dos quais 81% apresentaram sinais e sintomas leves, 14% evoluíram de forma severa e 5% estiveram criticamente doentes. A evolução para SRAG se relaciona não só com a infecção viral, mas também com a resposta imunocelular inflamatória do hospedeiro (Wu; McGoogan, 2020).

A pneumonia é a apresentação clínica mais comum. O pulmão apresenta lesões bilaterais com envolvimento de múltiplos lobos, predominantemente na parte posterior e periférica dos pulmões. Na tomografia de tórax, essas lesões se apresentam na maioria dos casos como opacidades em vidro fosco. Uma avaliação da imagem da tomografia de tórax de 51 pacientes evidenciou opacidades em vidro fosco puras em 77% dos pacientes, opacidades em vidro fosco com espessamento septal intersticial e/ou interlobular em 75% dos pacientes e opacidades em vidro fosco com consolidação em 59% dos pacientes (Song et al., 2020).

Nos Estados Unidos, entre 373 mil indivíduos não vacinados, 70% apresentaram febre, tosse ou falta de ar, 36% relataram dores musculares, 34% relataram cefaleia, 20% dor de garganta e 19% diarreia (Stokes et al., 2020). Distúrbios do olfato e paladar, como anosmia e disgeusia, foram frequentemente relatados. Uma meta-análise mostrou que a prevalência combinada para alterações de cheiro ou paladar foram de 52% e 44%, respectivamente (TONG et al., 2020). Embora essas alterações ocorram mais comumente na COVID-19 do que em outras viroses respiratórias, elas não são específicas dessa doença (Boscolo-Rizzo et al., 2020).

Os achados dermatológicos em pacientes com COVID-19 foram descritos em um estudo prospectivo espanhol como cinco padrões de lesões cutâneas: erupções maculopapulares (47%), urticariformes (19%), vesiculares (9%), livedo reticular transitório ou necrose (6%). Nódulos púrpura-avermelhados nos dedos distais semelhantes em aparência ao pério (frieiras) também foram descritos, principalmente em crianças e adultos jovens (Galván Casas et al., 2020).

A síndrome do desconforto respiratório agudo é a principal complicação em pacientes com doença grave. Tipicamente, a dispneia se inicia oito dias após o início dos sintomas e pode progredir rapidamente para insuficiência respiratória (Wang et al., 2020).

Outra complicação da COVID-19 é o tromboembolismo venoso como a trombose venosa profunda extensa e embolia pulmonar. Ocorre em até um terço dos pacientes na unidade de terapia intensiva (UTI), apesar do uso da anticoagulação profilática. Também há relatos de trombose arterial, incluindo o sistema nervoso central. Um estudo que incluiu cerca de três mil indivíduos com COVID-19 relatou acidente vascular cerebral em 1,6% e infarto do miocárdio em 8,9% dos participantes (Bilaloglu et al., 2020).

Um estudo de autópsia que comparou a patologia pulmonar de sete indivíduos que morreram de COVID-19 encontrou lesão endotelial grave (endotelite), trombose generalizada com microangiopatia e microtrombos capilares alveolares, juntamente com aumento da angiogênese. Essas características foram mais proeminentes nos pulmões de pacientes falecidos por COVID-19 em comparação com os de controles falecidos de influenza ou outras causas. Essa injúria endotelial aguda desempenha um papel significativo nos eventos tromboembólicos (Ackermann et al., 2020).

Outro fator que colabora com este estado pró-trombóticos é a hipercoagulabilidade encontrada em pacientes com COVID-19, evidenciada através de alterações nos seguintes fatores: fator VIII elevado, fibrinogênio elevado, micropartículas pró-trombóticas circulantes, armadilhas extracelulares de neutrófilos e hiperviscosidade (Ackermann et al., 2020).

Há também complicações cardíacas como arritmias, lesão cardíaca aguda e choque. Em uma série de 21 casos, a apresentação clínica da COVID-19 em indivíduos internados em unidade de terapia intensiva (UTI) em fevereiro de 2020, incluiu relatos de cardiomiopatia em um terço dos pacientes (Arentz et al., 2020).

2.4.2 COVID-19 longa

Conforme definido pela OMS, a COVID-19 longa se caracteriza pela persistência de sintomas para além de três meses após o início dos sintomas na fase aguda que duram pelo menos dois meses e não podem ser atribuídos a outro diagnóstico. Os sintomas podem flutuar ou recidivar com o tempo e impactam no funcionamento diário (OMS, 2021). A incidência estimada da COVID-19 longa é 10 a 30 % nos casos não hospitalizados, 50 a 70% nos casos hospitalizados e 10 a 12% dos casos vacinados. A maioria dos casos são diagnosticados em pacientes não hospitalizados, entre 36 e 50 anos (Fair Health, 2022).

Os sintomas mais frequentemente relatados são fadiga (98,3%), mal-estar após esforço (89%) e disfunção cognitiva (Davis et al., 2021). Muitos outros sintomas foram descritos menos comumente, tais como sensação de zumbido, alucinações visuais, tremores, coceira na pele, alterações no ciclo menstrual, disfunção sexual, palpitações cardíacas, problemas de controle da bexiga, perda de memória, visão turva, diarreia, entre outros (Michelen et al., 2021).

Há várias hipóteses para explicar a patogênese da COVID longa incluindo persistência viral de SARS-CoV-2 nos tecidos, desregulação imune com ou sem reativação de viroses latentes como Epstein-Barr e Citomegalovírus, impacto de SARS-CoV-2 na microbiota, incluindo o viroma, autoimunidade pela produção de auto-anticorpos, disfunção endotelial microvascular, sinalização disfuncional no tronco cerebral e nervo vago (Proal; Vanelzakker, 2021; Spudich; Nath, 2022; Manoharan; Ying, 2023).

Embora um terço das pessoas com COVID longa não tenham sido identificadas com condições pré-existent, alguns fatores de risco foram relatados, como sexo feminino, diabetes tipo 2, desordem do tecido conjuntivo, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, rinite alérgica e urticária crônica (Su, 2022; Renz-polster et al. 2022). Além disso, fatores socioeconômicos como baixa renda e impossibilidade de descansar nas semanas seguintes também foram observados (Ziauddeen et al., 2022).

3 HIPÓTESE E MODELO TEÓRICO

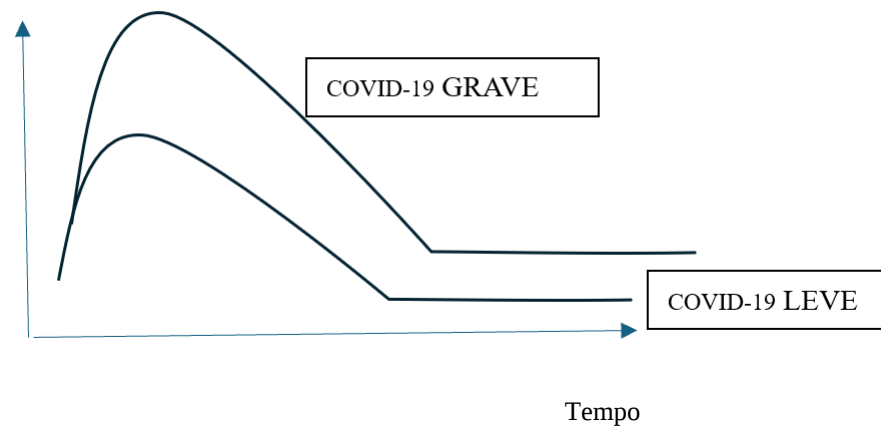
3.1 HIPÓTESE

Anticorpos específicos IgG-S contra o SARS-CoV-2 estão em maior concentração e persistem por mais tempo em indivíduos não vacinados recuperados da COVID-19 grave em comparação com os recuperados da COVID-19 leve após primeira infecção.

3.2 MODELO TEÓRICO

Figura 5 – Modelo teórico proposto para a resposta humoral de IgG-S ao SARS-CoV-2

IgG-S



Fonte: O autor

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a cinética de anticorpos específicos IgG-S contra o SARS-CoV-2 em pacientes recuperados da primeira infecção, de acordo com a gravidade da doença, e identificar os fatores associados à negatificação sorológica em 386 dias após o início dos sintomas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em indivíduos não vacinados recuperados da primeira infecção por SARS-CoV-2:

- caracterizar a população do estudo quanto a fatores biológicos, sintomas, comorbidades (hipertensão arterial, diabetes melitus, obesidade) e presença de anticorpos específicos IgG-S1 contra o SARS-CoV-2 de acordo com a gravidade da COVID-19;
- identificar os fatores associados ao nível sérico de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2;
- comparar a concentração sérica de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 entre os grupos de COVID-19 leve e grave em diferentes fases da convalescência (até 90 dias, de 91 a 180 dias e mais de 180 dias após o início dos sintomas);
- comparar a concentração sérica de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 no grupo de COVID-19 grave entre os submetidos à ventilação mecânica invasiva (VMI) e os que não necessitaram de VMI em diferentes fases da convalescência (até 90 dias, de 91 a 180 dias e mais de 180 dias após o início dos sintomas);
- correlacionar nível sérico de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 com a idade;
- estimar a probabilidade de persistência de anticorpos IgG-S1 de acordo com a gravidade no período de seguimento;
- identificar fatores associados à não soroconversão de IgG-S1.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E PERÍODO

Estudo de coorte prospectivo realizado entre agosto de 2020 e junho de 2021 no ambulatório de egresso para recuperados da COVID-19 do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC - UFPE) e do Centro Médico Hospitalar da Polícia Militar de Pernambuco (CMH - PMPE). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807).

Fator de exposição: Gravidade da COVID-19

Grupo de Expostos: pacientes que necessitaram de hospitalização

Grupos de Não-Expostos: paciente que não necessitaram de hospitalização

Desfecho: presença e nível de anticorpos séricos IgG-S1

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população alvo foi composta por dois grupos:

Grupo A (Não-expostos) – pacientes com diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR em swab de naso-orofaringe, de ambos os sexos, atendidos no ambulatório do HC-UFPE ou do CMH-PMPE, que não necessitaram de internamento por COVID-19, apresentando-se com sinais e sintomas leves.

Grupo B (Expostos) – pacientes com diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR em swab de naso-orofaringe, de ambos os sexos, que necessitaram de internamento no HC-UFPE ou no CMH- PMPE. O grupo B foi estratificado em pacientes que não necessitaram de oxigenoterapia invasiva e os que demandaram VMI.

5.2.1 Critérios de inclusão

- Idade igual ou superior a 18 anos
- Diagnóstico por PCR positivo para primeira infecção por SARS-CoV-2.

5.2.2 Critérios de exclusão

- Excluídas amostras coletadas de paciente após receber, pelo menos, uma dose de vacina anti-SARS-CoV-2.
- Gestante.

5.3 AMOSTRA

5.3.1 Tipo de amostragem

Trata-se de amostragem do tipo probabilística casual simples estratificada. A população do estudo foi subdividida em estratos mais homogêneos considerando a gravidade da apresentação clínica da COVID-19. Definiram-se dois estratos: pacientes não hospitalizados (COVID-19 leve) e hospitalizados (COVID-19 grave). Em cada estrato, realizou-se a distribuição das unidades de amostra de forma casual (aleatória). Dessa forma, todos os pacientes recuperados da COVID-19 que compareceram ao ambulatório de egresso foram recrutados para aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa realizou-se em duas etapas.

Primeira Etapa

A primeira etapa envolveu o recrutamento de indivíduos com exame de RT-PCR em swab de naso-orofaringe para SARS-CoV-2 positivo realizados no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) para coleta de sangue e o preenchimento da ficha de coleta de dados (APÊNDICE B). Os participantes tinham, pelo menos, 14 dias do início dos sintomas e estavam assintomáticos ao comparecerem à primeira consulta. As consultas realizaram-se conforme demanda do quadro clínico dos indivíduos.

Grupo A – pacientes que não necessitaram de internamento hospitalar receberam um convite para participar da pesquisa por ligação telefônica ou por mensagem de texto via celular. O acesso para o contato desses indivíduos foi por meio de uma lista cadastral elaborada pelo núcleo de vigilância epidemiológica dos dois hospitais.

Na primeira consulta, após a assinatura do consentimento formal de aceitação (Termo e Consentimento Livre e Esclarecido – APÊNDICE A), realizou-se uma coleta de sangue para a

dosagem de anticorpos IgG-S1. A coleta de sangue ocorreu nas consultas subsequentes, sempre após a autorização do paciente.

Grupo B – As pessoas sintomáticas que necessitaram de internamento hospitalar e realizaram exame de RT-PCR em swab de naso-orofaringe para SARS-CoV-2 no LACEN-PE com resultado positivo. Durante a hospitalização, o paciente ou a família receberam o convite para participar da pesquisa e foi ofertada a assinatura do consentimento formal de aceitação.

A coleta de sangue respeitou a demanda de exames laboratoriais pela equipe médica assistente, não houve coleta extra para atender a pesquisa durante internamento. Quando o paciente recebia alta ou evoluiu para óbito sem receber o convite da pesquisa no hospital, a família recebeu um convite para participar da pesquisa por ligação telefônica ou por mensagem de texto via celular. O acesso ao contato desses indivíduos foi pelo núcleo de vigilância epidemiológica dos hospitais ou dos dados cadastrais eletrônicos.

Segunda Etapa

A segunda etapa correspondeu ao transporte, armazenamento e processamento das amostras de sangue periférico.

As amostras de sangue coletadas (3 ml a 5 ml de sangue) foram depositadas em tubos com gel separador devidamente identificados e etiquetados com nome completo do participante, e imediatamente centrifugadas no local de coleta. Em seguida, foram transportadas por via terrestre, em caixa térmica com gelo reciclável, mantendo a temperatura entre 4 °C a 8 °C, organizadas em estantes, conforme orientação da Agência Nacional de Vigilância (Anvisa). Ao chegar ao laboratório de Imunologia do Núcleo de Plataformas Tecnológicas, do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, os soros foram transferidos para tubos Eppendorf de 2 mL e congelados a -70 °C, para armazenamento em Biobanco.

Para a aferição da concentração sérica de IgG-S1, utilizou-se o Euroimmun anti-SARS-CoV-2 ELISA (Lubeck, Alemanha), um dos primeiros ensaios de diagnóstico com a marca CE (Conformidade Europeia) desenvolvido e disponível em todo o mundo. Avalia a resposta de IgG à proteína pico 1 (S1). Este Kit semiquantitativo demonstrou sensibilidade cumulativa de 82,6% para detecção de IgG em amostras coletadas após 14 dias do RT-PCR e especificidade de 86,9% (Gededzha et al., 2021). Para execução do teste, foram seguidas as instruções do fabricante. O ensaio semiquantitativo dos resultados foi obtido através da razão entre o valor da absorbância da amostra do paciente pelo valor da absorbância do calibrador. Resultados <0,8 foram negativos, $\geq 1,1$ positivos e $\geq 0,8$ e < 1,1 foram indeterminados para a presença de IgG-S1.

Todos os testes de RT-PCR para detecção do RNA do SARS-CoV-2, realizados em amostras de swab nasofaríngeo, foram analisadas no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) com primers específicos para SARS-CoV-2 e sondas direcionadas a duas regiões do gene da RNA polimerase dependente de RNA viral, conforme orientação técnica da OMS.

5.5 DEFINIÇÃO DE TERMOS E CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS

5.5.1 Definição de termos

- COVID-19 grave: pacientes que necessitaram de hospitalizaram
- COVID-19 leve: pacientes sintomáticos que não necessitaram de hospitalização
- Oxigenioterapia não-invasiva: uso de cateter nasal ou máscara não-reinalante.
- Oxigenioterapia invasiva: uso de VMI
- Obesidade: índice de massa corpórea maior ou igual a 30.
- Amostra positiva para IgG-S1 contra SARS-CoV-2: resultado semiquantitativo do Euroimmun ≥ 1 .
- Soropositivo para IgG-S1: indivíduo com pelo menos uma amostra positiva para IgG-S1.
- Soronegativa para IgG-S1: indivíduo que forneceram duas ou mais amostras, todas negativas para IgG-S1.

As amostras foram agrupadas conforme o tempo da coleta após início dos sintomas: até 90 dias, entre 91 e 180 dias, depois de 180 dias.

5.5.2 Variáveis

Quadro 1 – Variáveis

Variável Dependente	Definição Conceitual	Definição Operacional	Categorização
Soropositivo IgG-S1 (Presença de Anticorpo IgG-S1)	Imunoglobulina produzida pelo sistema imunológico contra a subunidade S1 da proteína Spike do SARS-CoV-2 na COVID-19 em pelo menos uma amostra de sangue periférico	Calculado através da razão entre o valor da absorbância da amostra do paciente pelo valor da absorbância do calibrador (ensaio semiquantitativo)	Qualitativa ordinal 1-Positivo ($\geq 1,1$) 2-Negativo ($< 0,8$) 3-Indeterminado ($> 0,8 < 1,1$)
Títulos de Anticorpo IgG-S1	Imunoglobulina produzida pelo sistema imunológico contra a subunidade S1 da proteína	Calculado através da razão valor da absorbância da amostra do paciente pelo	Quantitativa contínua

	Spike do SARS-CoV-2 na COVID-19 em sangue periférico	valor da absorbância do calibrador (ensaio semiquantitativo)	
Soronegativo para IgG-S1	Ausência da Imunoglobulina IgG-S1 em todas as amostras sangue periférico fornecidas	Calculado através da razão entre o valor da absorbância da amostra do paciente pelo valor da absorbância do calibrador (ensaio semiquantitativo)	Qualitativa nominal 1 – Sim ($\geq 1,1$) 2- Não ($< 1,1$)

Fonte: Dados da pesquisa.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO ORIGINAL 1 – Resposta robusta de anticorpos em casos graves de doença causada pelo SARS-CoV-2 (Aceito para publicação no BMC Infectious Disease)

Introdução

Desde o início da pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19), busca-se compreender a cinética de anticorpos anti-SARS-CoV-2, principalmente a duração dos níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) em razão de seu papel protetor na reinfecção (Gallais et al., 2021; Long et al., 2020; Lumley et al., 2021). Duas hipóteses têm preocupado: a primeira é o declínio dos níveis séricos dos anticorpos IgG ao longo do tempo; a segunda é a maior chance de indivíduos com COVID-19 leve não soroconverterem ou gerar resposta imune modesta em comparação àqueles com COVID-19 grave (Kowitdamrong et al., 2020; Long et al., 2020; Seow et al., 2020).

Os primeiros estudos sugerem um declínio rápido dos anticorpos IgG anti-Spike (IgG-S), a proteína utilizada pelo coronavírus para entrar nas células, entre três a seis meses após a infecção (Dan et al., 2021; Figueiredo-Campos et al., 2020; Gabler et al., 2021). Dados posteriores mostraram a persistência de anticorpos IgG-S por até oito meses em indivíduos não hospitalizados (Sherina et al., 2021; Tian et al., 2021a). Uma coorte prospectiva com seguimento de 13 meses evidenciou queda significativa nos níveis séricos de anticorpos IgG-S, mais rápida no sexo masculino (Gallais et al., 2021). Neste estudo, não foi possível verificar associação com a gravidade da doença, visto que apenas 4% dos indivíduos necessitaram de hospitalização.

Mais recentemente, uma avaliação sobre a permanência sérica dessas moléculas em indivíduos que tiveram a doença sugeriu que há dois tipos de anticorpos anti-SARS-CoV-2: anticorpos com meia-vida após 6 meses e anticorpos com meia-vida até 14 meses (ROSATI et

al., 2021). A maioria dos estudos sobre resposta humoral em pacientes com COVID-19 grave evidenciou a associação da gravidade da doença com altos títulos de anticorpos (Imai et al., 2021; Ren et al., 2020; Roltgen et al., 2020). No entanto, o curto tempo de seguimento desses trabalhos não permitiu aos autores avaliarem o impacto da gravidade da COVID-19 na persistência do anticorpo IgG além de 120 dias.

O objetivo deste estudo prospectivo foi comparar níveis séricos e longevidade do anticorpo IgG-S entre indivíduos com COVID-19 grave e leve, bem como identificar fatores clínicos e biológicos que possam estar associados à dinâmica de anticorpos IgG-S, em indivíduos recuperados da COVID-19, não vacinados, após a primeira infecção por SARS-CoV-2 em 12 meses de seguimento após início dos sintomas.

Método

Um estudo longitudinal prospectivo, descritivo com caráter analítico realizou-se em dois hospitais públicos de alta complexidade da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. Entre agosto de 2020 e junho de 2021, recrutaram-se indivíduos, com idade igual ou maior que, atendidos em ambulatórios para pacientes recuperados da COVID-19. O ingresso ao ambulatório ocorreu por encaminhamento do médico assistente após a alta hospitalar, por demanda espontânea ou após convite por contato telefônico da equipe desta pesquisa. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa (CEP) institucional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807).

Na primeira consulta, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os participantes preencheram um questionário sobre as características sociodemográficas, sintomas, comorbidades, necessidade de internamento e foram submetidos à coleta de sangue periférico. Aqueles sem resultado de RT-PCR ou com RT-PCR para SARS-CoV-2 negativo foram excluídos, bem como os indivíduos vacinados para COVID-19.

Todos os testes de RT-PCR para detecção do RNA do SARS-CoV-2, realizados em amostras de swab nasofaríngeo, foram analisados no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE).

Dividiram-se os participantes em dois grupos: Casos Graves: definidos como aqueles que necessitavam de hospitalização; Casos Leves: definidos como aqueles que não precisaram de hospitalização. O grupo Casos Graves foi ainda estratificado de acordo com a demanda de oxigênio: oxigenioterapia não invasiva (cateter nasal e máscara não reinalante) e invasiva (VMI). A longevidade e o nível sérico dos anticorpos foram avaliados por 3 tempos após o início dos sintomas: até 90 dias, entre 91 e 180 dias, e após 180 dias. Das 238 pessoas incluídas

no estudo, 151 contribuíram com uma amostra de sangue periférico e 87 com duas ou mais amostras.

Para a dosagem da concentração sérica de IgG-S1, utilizou-se o kit da Euroimmun anti-SARS-CoV-2 ELISA (Lubeck, Alemanha), um dos primeiros ensaios de diagnóstico com a marca CE (Conformidade Europeia) desenvolvido e disponível em todo o mundo. O princípio dessa metodologia é quantificar IgG específica à proteína pico 1 (S1) do SARS-Cov-2 por meio de um ensaio imunoenzimático, em que os resultados são apresentados em absorbâncias (densidade óptica). Esse Kit demonstrou sensibilidade cumulativa de 82,6% para detecção de IgG em amostras coletadas após 14 dias do RT-PCR e especificidade de 86,9% (GEDEDZHA et al., 2021). Para execução do teste, seguiram-se as instruções do fabricante. O ensaio semiquantitativo dos resultados foi por meio da razão entre o valor da absorbância da amostra do paciente pelo valor da absorbância do calibrador. Resultados $<0,8$ foram negativos, $\geq 1,1$ positivos e $\geq 0,8$ e $< 1,1$ foram indeterminados para presença de IgG-S1.

Análise estatística

Na análise estatística, utilizaram-se os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. O teste do qui-quadrado e o teste da soma de postos de Kruskal-Wallis foram conduzidos para identificar diferenças significativas nas variáveis categóricas entre os grupos. Utilizamos o teste de Mann-Whitney para comparar dados quantitativos entre grupos. Todos os testes foram bilaterais com um nível de 0,05. Os dados em falta foram excluídos para análise. Calculada a razão de chances - Odds ratio (OR) com Intervalo de Confiança.

As variáveis incluídas na análise univariável foram as seguintes: hospitalização, sexo, idade, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), obesidade, títulos de anticorpos IgG-S1 em até 90, 91-180, após 180 dias. As variáveis que alcançaram um valor de $p < 0,2$ na análise univariável foram inseridas em um modelo de regressão linear pelo método de ENTER.

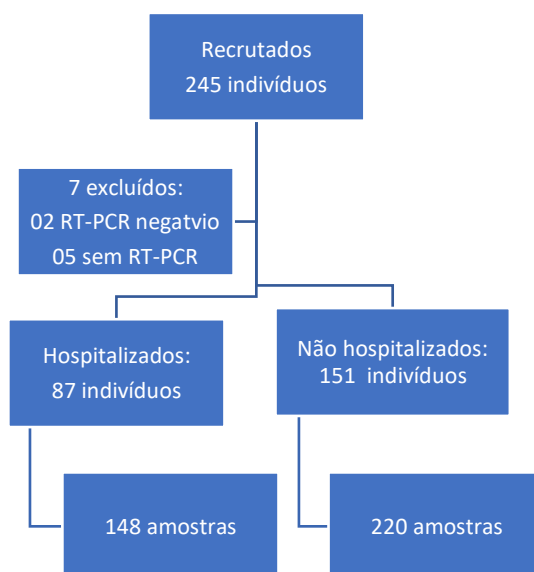
Utilizamos a curva de Kaplan-Meier para estimar a probabilidade de persistência do IgG-S. Realizou-se um controle de qualidade dos modelos: a suposição de linearidade e a qualidade da variância da variável dependente em toda a gama de valores da variável independente foram avaliadas com gráficos de dispersão; e a suposição de que a variável dependente é normalmente distribuída foi avaliada com um gráfico de probabilidade normal (dados não mostrados). Os pesquisadores não foram “cegos” no recrutamento dos participantes nem na avaliação dos resultados. No entanto, a realização dos ensaios para detecção de IgG-S foi totalmente às cegas, visto que a identificação das amostras biológicas não definia a

estratificação dos grupos. Apenas a análise final dos dados revelou uma visão global dos resultados. Os potenciais fatores de confusão foram identificados e controlados na análise dos dados.

Resultados

Para o ambulatório de recuperados da COVID-19, encaminharam-se 245 indivíduos, dos quais, foram excluídos dois por terem apresentado teste molecular negativo e cinco por não apresentarem o resultado do teste. Assim, 238 indivíduos foram incluídos no estudo e contribuíram com 368 amostras. Os 87 participantes que estiveram hospitalizados forneceram 148 amostras de sangue periférico e os 151 participantes que não foram hospitalizados contribuíram com 220 amostras de sangue periférico ao longo de 386 dias após o início dos sintomas (Figura 6).

Figura 6 – Triagem, inscrição e estratificação



Características clínicas e biológicas de indivíduos recuperados da COVID-19 de acordo com a hospitalização (Tabela 1)

Indivíduos do sexo masculino foram mais frequentes entre os hospitalizados (65,5%, $p=0,01$). No grupo de hospitalizados, 36 (41,1 %) pacientes estavam com 60 ou mais anos de idade ($<0,001$). Entre os 151 participantes não hospitalizados, sintomas como alteração de olfato ou paladar, dor de garganta e cefaleia foram significativamente mais frequentes neste grupo. Por outro lado, a febre, a tosse e a dispneia foram mais comuns no grupo hospitalizado.

A presença de anticorpos IgG-S1 específicos ao SARS-CoV-2 verificou-se em 313 amostras. 42 amostras classificaram-se como negativas para anticorpos IgG específicos ao SARS-CoV-2. Destas, foram 39 amostras de pacientes recuperados, não hospitalizados, e três amostras foram de pacientes recuperados que estiveram hospitalizados.

Tabela 1 – Características clínicas e biológicas de 238 indivíduos recuperados da COVID-19 de acordo com a hospitalização em 386 dias após primeira infecção

Variáveis	Hospitalização		OR	IC 95% OR	p-valor
	Sim n (%)	Não n (%)			
Sexo					
Masculino	57 (65,5%)	73 (48,3%)	2,03	1,18 – 3,50	0,010 *
Feminino	30 (34,5%)	78 (51,7%)	1,00	---	
Idade (anos)					
18 a 45	14 (16,1%)	67 (44,4%)	1,00	---	<0,001 *
46 a 59	37 (42,5%)	65 (43,0%)	2,72	1,35 – 5,50	
≥ 60	36 (41,1%)	19 (12,6%)	9,07	4,07 – 20,19	
Presença de sintomas					
Febre	61 (70,1%)	74 (50,0%)	2,35	1,34 – 4,11	0,003 *
Tosse	64 (73,6%)	72 (48,6%)	2,94	1,65 – 5,22	<0,001 *
Dispneia	74 (85,1%)	46 (31,1%)	12,62	6,37 – 25,03	<0,001 *
Sem Alteração no olfato	48 (55,2%)	49 (33,1%)	2,49	1,14 – 4,28	<0,001 *
Mialgia	40 (46,0%)	74 (50,0%)	0,85	0,50 – 1,45	0,551 *
Astenia	45 (51,7%)	84 (56,8%)	0,82	0,48 – 1,39	0,454 *
Dor de garganta	11 (12,6%)	51 (34,5%)	0,28	0,13 – 0,56	<0,001 *
Diarreia	18 (20,7%)	46 (31,1%)	0,58	0,31 – 1,08	0,084 *
Dor abdominal	10 (11,5%)	19 (12,8%)	0,88	0,39 – 1,99	0,762 *
Cefaleia	28 (32,2%)	100 (67,6%)	0,23	0,13 – 0,40	<0,001 *
Ausência de sintomas	0 (0,0)	11 (7,3%)	---	---	---
Comorbidades					
HAS	59 (67,8%)	35 (23,8%)	6,74	3,74 – 12,15	<0,001 *
T2DM	33 (37,9%)	13 (8,8%)	6,30	3,08 – 12,88	<0,001 *
Obesidade	38 (46,3%)	50 (36,2%)	1,52	0,87 – 2,64	0,139 *
Oxigenioterapia					
Não invasiva	69 (79,3%)	---	---	---	---
Ventilação mecânica invasiva	18 (20,7%)	---	---	---	---
Esteve em CTI	29 (33,3%)	---	---	---	---
Distribuição das amostras, n					
Até 90 DAS	72 (48,6%)	75 (34,1%)	---	---	0,003 *
91 a 180 DAS	41 (27,7%)	58 (26,4%)	---	---	-
> 180 DAS	35 (23,6%)	87 (39,5%)	---	---	-
Presença de Anticorpo IgG-S					
Positivo	145 (98,0%)	168 (76,4%)	11,22	3,40 – 37,07	<0,001 *
Negativo	3 (2,0%)	39 (17,7%)	1,00	---	
Indeterminado	0 (0,0)	13 (5,9%)	**	**	

(*) Qui-Quadrado (**) Não Calculável. HAS: Hipertensão arterial sistêmica; T2DM: diabetes mellitus tipo 2; CTI: unidade de terapia intensiva de UTI; DASO dias após o início dos sintomas; IgG-S: imunoglobulina G anti-spike; OR:Odds Ratio.

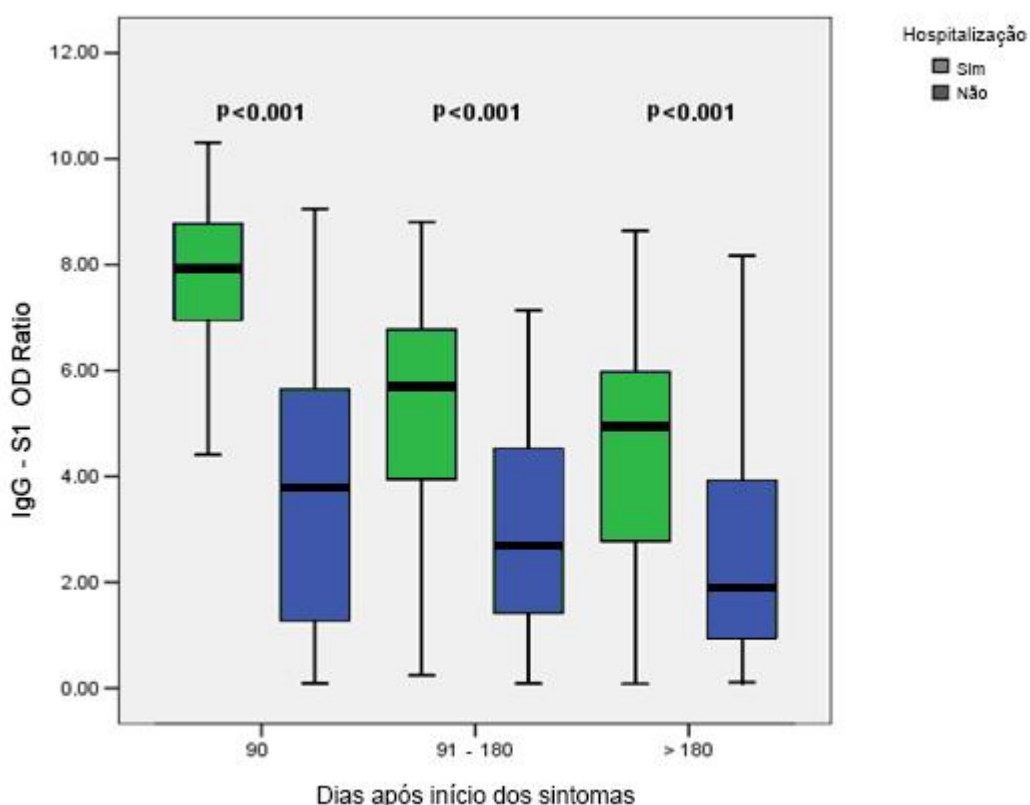
Comorbidades como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus foram mais prevalentes entre hospitalizados ($p < 0,001$). Todos os participantes hospitalizados receberam

suporte com oxigenioterapia. Dentre estes, receberam oxigenioterapia não invasiva 69 (79,3%); receberam suporte ventilatório invasivo 18 (20,7%), e estiveram internados em unidade de terapia intensiva. 29 (33,3%).

Fatores que impactam na resposta de IgG-S1 específico ao SARS-CoV-2

A comparação da mediana do nível sérico de anticorpos IgG-S1, entre amostras de Grupo Leve e Grupo Grave, demonstrou títulos séricos de IgG-S1 mais elevado entre os pacientes do Grupo Grave em todos os tempos de coleta analisados ao longo de 386 dias ($p < 0,001$). Por outro lado, observou-se a queda dos títulos séricos de IgG-S nos dois grupos, apesar da persistência do IgG-S1 durante o período de seguimento do estudo (Figura 7).

Figura 7 – Comparação de médias de título sérico de anticorpo IgG-S1 em 238 indivíduos recuperados da COVID-19 conforme a hospitalização em até 386 dias após a primeira infecção por SARS-CoV-2



OD Ratio: razão entre o nível de absorbância da amostra do paciente e o nível de absorbância do calibrador.

Significativamente, maiores níveis de IgG-S1 foram encontrados nas amostras coletadas até 90 dias do início dos sintomas comparando com amostras coletadas após 90 dias e 180 dias do início dos sintomas (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatores que impactam no nível sérico de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 em amostras de indivíduos recuperados depois da primeira infecção

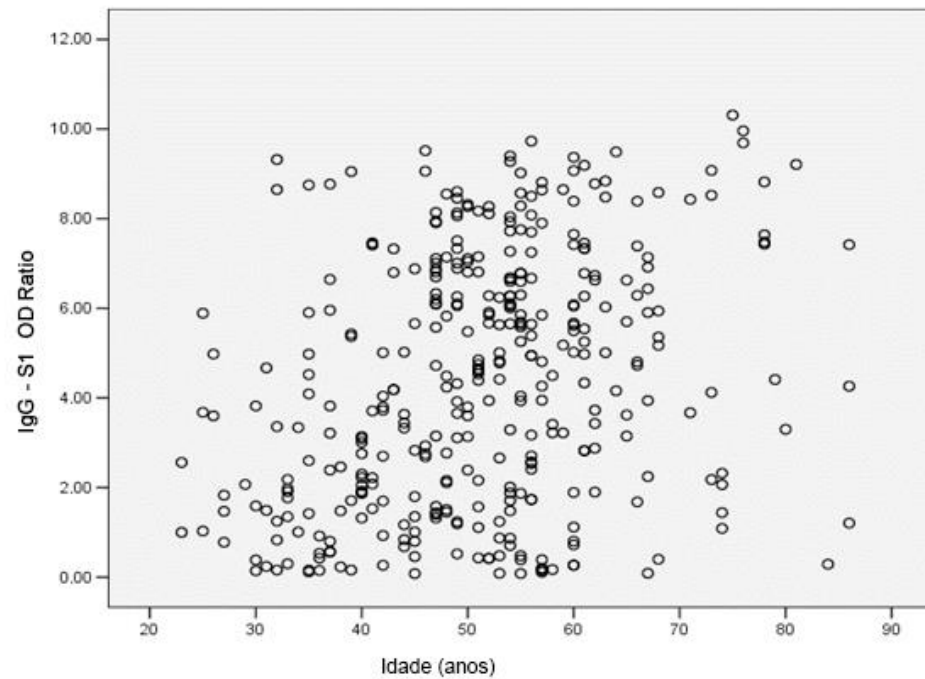
Variáveis	Anticorpo IgG	p-valor
	Mediana (Q1; Q3)	
Hospitalização		
Sim	6,76 (4,98; 8,14)	< 0,001 *
Não	2,67 (1,18; 4,74)	
Sexo		
Masculino	4,95 (1,73; 7,33)	0,033 *
Feminino	3,70 (1,90; 6,07)	
Obesidade		
Sim	4,96 (2,49; 6,81)	0,014 *
Não	3,62 (1,47; 6,78)	
Sintomas no diagnóstico		
1-3	3,92 (1,32; 6,70)	0,026 **
4-5	5,02 (2,67; 7,38)	
≥6	4,16 (1,82; 6,31)	
Idade (anos)		
18-45	2,20 (1,01; 4,08)	< 0,001 **
46 a 59	5,33 (2,60; 6,98)	
Maior ou igual a 60	5,65 (3,19; 7,45)	
HAS		
Sim	5,85 (3,26; 7,42)	< 0,001 *
Não	3,27 (1,42; 5,83)	
T2DM		
Sim	5,97 (3,94; 7,64)	< 0,001 *
Não	3,81 (1,58; 6,29)	
Dias após início dos sintomas (dias)		
Até 90	6,20 (3,43; 8,08)	< 0,001 **
91 a 180	3,82 (2,05; 6,10)	
> 180	2,63 (1,25; 5,01)	

(*) Teste de Mann-Whitney (**) Kruskal-Wallis

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; T2DM: diabetes mellitus tipo 2

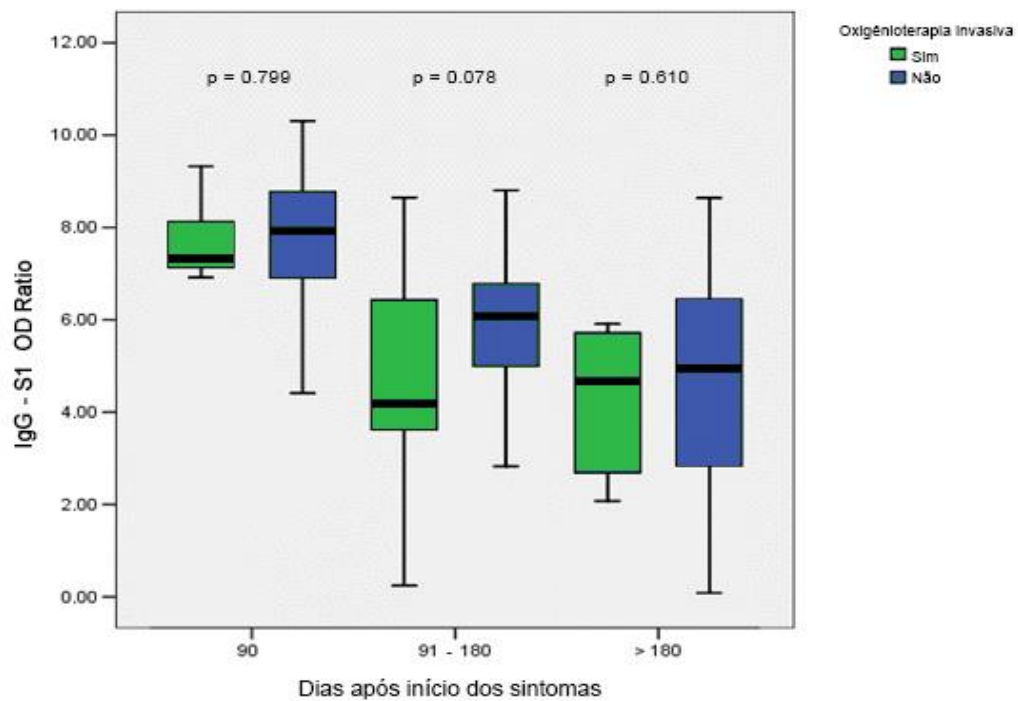
Maiores níveis de IgG-S1 foram encontrados em indivíduos do sexo masculino, obesos, hipertensos e com T2DM; e indivíduos com quatro ou mais sintomas no tempo do diagnóstico de COVID-19 (Tabela 2). Embora tenhamos encontrado uma fraca correlação do aumento da idade com a elevação de títulos séricos de IgG-S1 (Correlação de Spearman= 0,298, Figura 8), constatamos que indivíduos com mais de 45 anos apresentaram medianas de níveis de IgG-S1 significativamente mais elevadas quando comparadas com indivíduos mais jovens (Tabela 2). Por outro lado, não houve diferença entre as amostras dos participantes que receberam suporte de oxigenioterapia invasiva e não invasiva em todos os intervalos de dias após o início dos sintomas analisados (Figura 9, Figura 10).

Figura 8 – Coeficiente de Correlação Spearman entre títulos séricos de anticorpo IgG-S1 com a idade (Spearman correlation =0,298)



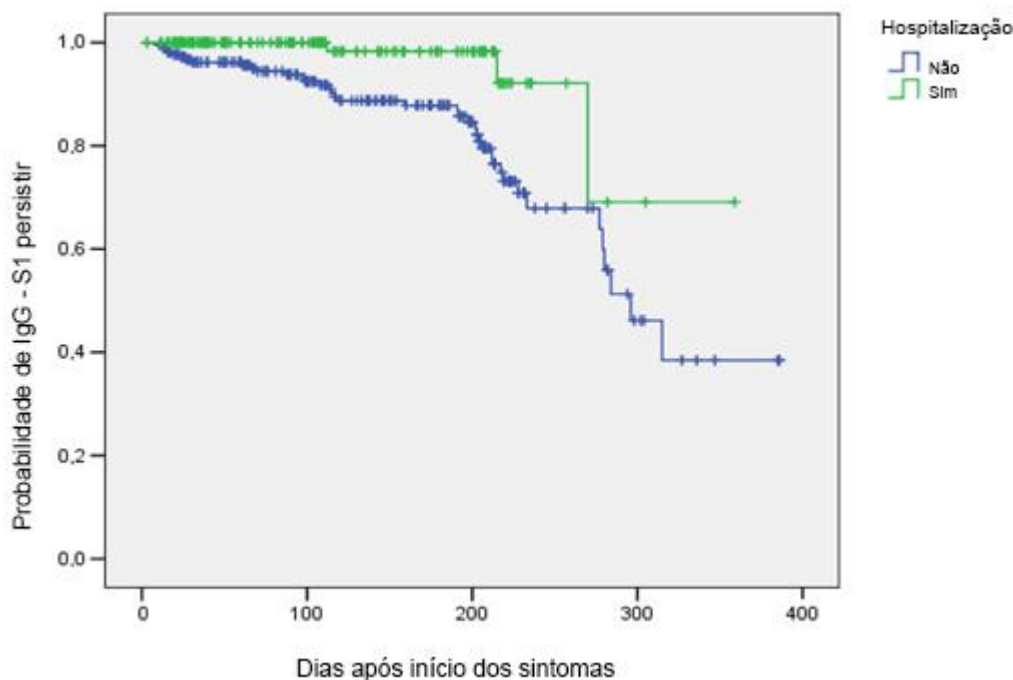
OD Ratio: razão entre o nível de absorbância da amostra do paciente e o nível de absorbância do calibrador

Figura 9 – Comparação de médias de títulos séricos de anticorpo IgG-S1 em 87 indivíduos hospitalizados recuperados de COVID-19 de acordo com a demanda de oxigênio



OD Ratio: razão entre o nível de absorbância da amostra do paciente e o nível de absorbância do calibrador

Figura 10 – Probabilidade de persistência do anticorpo IgG-S1 de acordo com a gravidade em 238 indivíduos recuperados da COVID-19 em 386 dias



Curva de Kaplan Meier: Log Rank (Mantel-Cox): Qui-Quadrado 10,1575 df 1 $p=0,001$. Testando igualdade de distribuição de sobrevivência para os diferentes níveis de Hospitalização). Houve maior probabilidade de o anticorpo IgG-S1 persistir ao longo do tempo entre amostras de indivíduos hospitalizados quando comparadas com amostras de participantes não hospitalizados ($p=0,001$).

Encontramos maior probabilidade de persistência de anticorpos IgG-S1 ao longo do tempo entre as amostras de indivíduos hospitalizados comparadas com as amostras dos participantes não hospitalizados ($p=0,001$) (Figura 10). As amostras com títulos de anticorpos IgG-S1 abaixo do cut-off (negativas) foram mais frequentes no grupo não hospitalizado, com menos de 60 anos e sem comorbidades.

Na análise multivariada (Tabela 3), apenas hospitalização, idade, quantidade de sintomas no momento do diagnóstico e o tempo de coleta das amostras após início dos sintomas permaneceram impactando na resposta humoral. A gravidade da COVID-19 manifestou o maior coeficiente de regressão. Estima-se que a necessidade de hospitalização aumente, em média, os títulos séricos de IgG-S1 em 2,91 unidades (coeficiente 2,91, $p=0,001$).

Tabela 3 – Modelo anticorpos IgG-S1

Variáveis	Coeficientes		p-valor
	Não padronizados	Padronizadas	
Constante	2,41	---	< 0,001
Dias após início dos sintomas	-0,01	-0,24	< 0,001
Idade (anos)	0,02	0,09	0,044
Sintomas no diagnóstico	0,14	0,10	0,014
Hospitalização	2,91	0,51	< 0,001

R Quadrado ajustado: 0,417

Variáveis que iniciaram no modelo: Sexo, Obesidade, HAS, T2DM, Hospitalização, Dias após início dos sintomas, Idade (anos) e Quantidade de Sintomas.

Discussão

Nossos resultados mostraram maiores médias de títulos de anticorpos IgG-S1 nas amostras do Grupo Grave em todos os intervalos de tempo estudados. Vários estudos já estabeleceram a associação da gravidade da COVID-19 com a magnitude da resposta humoral nos primeiros quatro meses após o início dos sintomas (Imai et al., 2021; Ren et al., 2020; Roltgen et al., 2020). Nossos resultados acrescentam que essa associação permanece ao longo de doze meses.

Maior carga viral e antigênica nos indivíduos graves suscita maior resposta de anticorpos IgG-S1 e justificam os achados do nosso trabalho (El Zein et al., 2021; Fajnzylber et al., 2020; Tsukagoshi et al., 2021). Embora ainda seja controverso que maiores cargas virais estejam associadas a piores desfechos na COVID-19 (Kim et al., 2021; Bdulrahman et al., 2021; Knudtzen et al., 2021; Trunfio et al., 2021).

Na análise univariada, a hospitalização parecia impactar igualmente as demais variáveis nos títulos séricos de IgG-S1. Após análise multivariada, observou-se no modelo final que a variável com maior influência no nível sérico de anticorpos IgG-S1 foi a hospitalização, ou seja, a apresentação grave da COVID-19.

Apesar da persistência IgG-S1, houve queda dos títulos desse anticorpo nos dois grupos ao longo do período de seguimento. Observou-se uma associação negativa entre a variável dias após o início dos sintomas e níveis de anticorpo IgG-S1, sugerindo que, à medida que o tempo passa, o título do anticorpo IgG-S1 diminui no sangue periférico. Desfecho semelhante ao nosso reproduziu-se em outros trabalhos (Peghin et al., 2021; Rosati et al., 2021). Essa dinâmica da resposta humoral na COVID-19 é análoga a outros vírus, incluindo aqueles que induzem imunidade ao longo da vida, como o sarampo na fase de contrair (Gibney et al., 2020; Rosati et al., 2021).

Encontramos maior frequência de soronegativação e maior probabilidade de soronegativação para IgG-S1 durante o seguimento no Grupo Leve. Essa afirmação também se encontra em um estudo que diz que 40% dos indivíduos assintomáticos e 12% dos sintomáticos negativaram a sorologia ao fim de 90 dias (Long et al., 2020). Supõe-se que o risco de reinfecção nessa população seja maior. No entanto, não é possível fazer essa conclusão, mais estudos são necessários. Um estudo retrospectivo não encontrou diferença de gravidade da COVID-19 ao comparar indivíduos com anticorpos IgG presentes e indivíduos com anticorpos IgG ausentes (Ding et al., 2022).

Em nossa amostra, verificamos fraca contribuição da idade na dinâmica de títulos séricos de IgG-S1 no modelo final. É controversa a ligação entre idade e anticorpos na COVID-19. A idade avançada foi um fator preditor para hospitalização em conformidade com vários estudos (Zhou et al., 2020; O'driscoll et al., 2021). A imunossenescência promove mudanças quantitativas nas células e componentes do sistema imune, bem como mudanças mais complexas na ação em diversas respostas imunes. O idoso tem sua capacidade de responder efetivamente a novos antígenos comprometidos, além da inflamação crônica de baixo grau impulsionada por um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda e estressores oxidativos (Aiello et al., 2019).

Corroborando nossos achados, o sexo masculino tem sido descrito como fator de risco para hospitalização, mas sem influenciar nos títulos séricos de anticorpos. Tem sido descritas diferenças entre os sexos na resposta imune à COVID-19 (Marina; Piemonti, 2020; Slam et al., 2021). O sexo masculino apresenta uma resposta pró-inflamatória às custas de IL-6, IL-8, GRO α , sCD4L, MIP-1 β , MCP-1 (QI et al., 2021). Alguns estudos demonstram maiores níveis de receptores ACE2, usados para a entrada viral nas células-alvo no homem. A serina protease celular TMPRSS2, responsável pela ativação da proteína pico (S) do coronavírus, também é altamente expressa no epitélio da próstata e é sensível aos andrógenos (Hoffmann et al., 2020). No entanto, não encontramos diferença nos títulos séricos de anticorpos IgG-S1 entre os sexos.

Assim como a variável sexo, comorbidades como HAS e T2DM perderam associação com a resposta humoral após ajustar para as demais variáveis. Foram mais frequentes em Grupo Grave, demonstrando uma ligação com a criticidade da COVID-19. A ligação da HAS com resposta de anticorpos IgG-S1 não tem sido objeto de estudo. É controversa a hipótese de que a hipertensão é preditor independente de gravidade (Bauer et al., 2020).

A combinação de HAS com T2DM, ou com outra comorbidade, pode ser mais relevante como preditor para COVID-19 grave (Sun et al., 2020). Por outro lado, está bem estabelecido que T2DM e hiperglicemia aumentam a chance de hospitalização, mas não representam uma

diminuição nos níveis séricos de anticorpo IgG-S após a primeira infecção por SARS-CoV-2 de linfócitos prejudicada, bem como uma disfunção de monócitos, macrófagos, neutrófilos e na ativação do complemento (DARYABOR et al., 2020; LAMPASONA et al., 2020).

A obesidade, após análise multivariada, não demonstrou impactar nos níveis séricos de anticorpo IgG-S1 neste estudo. No entanto, Frasca e colaboradores relataram títulos menores de anticorpos anti-IgG-S1 em indivíduos obesos, e índice de massa corpórea negativamente (FRASCA et al., 2021). Esses achados são compatíveis com o conhecimento de que a obesidade se associa à inflamação de baixo grau crônica e, por sua vez, a um sistema imune disfuncional (FRANCESCHI et al., 2000; MAYER-PICKEL et al., 2015).

Embora não seja um teste de neutralização viral, o Kit Euroimmun IgG-S1 semiquantitativo foi descrito apresentando forte correlação com o teste de neutralização (MONTESINOS et al., 2020). É importante salientar que o pequeno número de pacientes assintomáticos justifica-se pela dificuldade em encontrar esses pacientes na primeira onda da pandemia, quando os testes para COVID-19 eram escassos no Brasil e destinados a quem apresentava sintomas.

Em resumo, este estudo revelou maiores títulos e maior probabilidade de persistência de IgG-S1 em casos graves após primo-infecção por SARS-CoV-2 em pacientes recuperados não vacinados. Assim, neste estudo a apresentação clínica grave da COVID-19 foi o principal fator de influência nos níveis séricos e na persistência de anticorpos IgG-S1 na COVID-19.

Referências

ABDULRAHMAN, A.; MALLAH, S. I.; ALQAHTANI, M. Covid-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, p. 688, julho 2021.

AIELLO, A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2247, setembro 2019.

BAUER, A. Z. et al. Hypertension, medications, and risk of severe covid-19: A Massachusetts community-based observational study. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 23, n. 1, p. 21–27, janeiro 2021.

DAN, J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. **Science**, v. 371, n. 6529, p. eabf4063, fevereiro 2021.

DARYABOR, G. et al. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1582, jul. 2020.

DING, J. et al. Characteristics and prognosis of antibody non-responders with coronavirus disease 2019. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 813820, junho 2022.

EL ZEIN, S. et al. SARS-CoV-2 infection: Initial viral load (iVL) predicts severity of illness/outcome, and declining trend of iVL in hospitalized patients corresponds with slowing of the pandemic. **PLoS One**, v. 16, n. 9, p. e0255981, setembro 2021.

FAJNZYLBBER, J. et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. **Nature Communications**, v. 11, p. 5493, outubro 2020.

FIGUEIREDO-CAMPOS, P. et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in covid-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset. **European Journal of Immunology**, v. 50, n. 12, p. 2025-2040, dezembro 2020.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 244-254, junho 2000.

FRASCA, D. et al. Influence of obesity on serum levels of SARS-CoV-2-specific antibodies in covid-19 patients. **PLoS One**, v. 16, n. 3, março 2021.

GAEBLER, C. A. et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. **Nature**, v. 591, n. 7851, p. 639-644, março 2021.

GALLAIS, F. et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine**, v. 71, p. 103561, setembro 2021.

GEDEDZHA, M. P. et al. Performance of the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. **PLoS One**, v. 16, n. 6, p. e0252317, junho 2021.

GIBNEY, K. B. et al. Emergence of attenuated measles illness among IgG-positive/IgM-negative measles cases: Victoria, Australia, 2008-2017. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 6, p. 1060-1067, março 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, abril 2020.

HU, Y.; LU, P.; DENG, X.; GUO, H.; ZHOU, M. The declining antibody level of measles virus in China population, 2009-2015. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 906, julho 2018.

IMAI, K. et al. Antibody response patterns in Covid-19 patients with different levels of disease severity in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 5, p. 3211-3218, maio 2021.

ISLAM, N. et al. Excess deaths associated with covid-19 pandemic in 2020: age and sex disaggregated time series analysis in 29 high income countries. **BMJ**, v. 373, p. n1137, maio 2021.

KIM, Y. et al. Differential association of viral dynamics with disease severity depending on patients' age group in Covid-19. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 712260, julho 2021.

KNUDTZEN, F. C. et al. SARS-CoV-2 viral load as a predictor for disease severity in outpatients and hospitalised patients with Covid-19: A prospective cohort study. **PLoS One**, v. 16, n. 10, p. e0258421, outubro 2021.

KOWITDAMRONG, E. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0240502, outubro 2020.

LAMPASONA, V. et al. Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study. **Diabetologia**, v. 63, n. 12, p. 2548-2558, dezembro 2020.

LONG, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with Covid-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, junho 2020.

LONG, Q. X. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nature Medicine**, v. 26, n. 8, p. 1200-1204, agos. 2020.

LUMLEY, S. F et al. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 6, p. 533-540, fev. 2021.

MARINA, S.; PIEMONTE, L. **Gender and age effects on the rates of infection and deaths in individuals with confirmed SARS-CoV-2 infection in six European countries**. 2020. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=3576790>. Acesso em: 26 jun. 2024.

MAYER-PICKEL, K. Obesity and antiphospholipid syndrome: a particular challenge in pregnancy. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 2, n. 2, p. 46-56, ago., 2015.

MONTESINOS, I. et al. Neutralizing antibody responses following natural SARS-CoV-2 infection: Dynamics and correlation with commercial serologic tests. **Journal of Clinical Virology**, v. 144, p. 104988, nov. 2021.

O'DRISCOLL, M. et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 590, n. 7844, p. 140-145, fev. 2021.

ONIANGO, T. B. et al. SARS-CoV-2 specific immune responses in overweight and obese COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1- 11, nov. 2023.

PEGGING, M. et al. The fall in antibody response to SARS-CoV-2: a longitudinal study of asymptomatic to critically ill patients up to 10 months after recovery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 11, e0113821, out. 2021.

QI, S. et al. Sex differences in the immune response to acute Covid-19 respiratory tract infection. **Biology of Sex Differences**, v. 12, n. 1, dez. 2021.

REN, L. et al. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in Covid-19. **Communications Biology**, v. 3, p. 780, dez. 2020.

RÖLTGEN, K. et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. **Science Immunology**, v. 5, n. 54, p. eabe0240, dez. 2020.

ROSATI, M. et al. Sequential Analysis of Binding and Neutralizing Antibody in covid-19 Convalescent Patients at 14 Months After SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 793953, nov. 2021.

SEOW, J. et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 1598-1607, out. 2020.

SHERINA, N. et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent covid-19 patients 6-8 months after the infection. **Medicine**, v. 2, n. 3, p. 281-295.e4, mar. 2021.

SUN, Y. et al. Independent and combined effects of hypertension and diabetes on clinical outcomes in patients with covid-19: a retrospective cohort study of Huoshen mountain hospital and Guanggu Fangcang Shelter Hospital. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 23, n. 2, p. 218-232, dez. 2020.

TIAN, X. et al. Persistence of the SARS-CoV-2 antibody response in asymptomatic patients in correctional facilities. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, nov. 2021.

TRUNFIO, M. et al. Lowering SARS-CoV-2 viral load might affect transmission but not disease severity in secondary cases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 7, p. 914-915, jul. 2021.

TSUKAGOSHI, H. et al. Relationships between Viral Load and the Clinical Course of Covid-19. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 304, fev. 2021.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with Covid-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, mar. 2020.

6.2 ARTIGO ORIGINAL 2 – Fatores de risco para não soroconversão após primeira infecção por SARS-COV-2 (Enviado para publicação na Revista no BMC Infectious Disease)

Introdução

Desde o início da pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19), tem havido um esforço contínuo para compreender a cinética de anticorpos anti-SARS-CoV-2, incluindo os fatores de risco para não soroconversão (LONG et al., 2020; GALLAIS et al., 2021). A maioria dos indivíduos infectados pelo vírus desenvolve anticorpos detectáveis aproximadamente três semanas após a infecção (Lumley et al., 2021). No entanto, uma pequena porcentagem, variando de 1 a 9%, não apresenta anticorpos detectáveis durante esse período (Gudbjartsson et al., 2020; L'huillier et al., 2021).

Em outra análise, que usou testes sorológicos para detecção de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA (pan-Ig) contra o nucleocapsídeo e contra o domínio ligante de receptor da subunidade S1 da proteína spike, de um total de 22 pessoas recuperadas da COVID-19, que inicialmente apresentaram resultado negativo em amostra coletada precocemente, 19 obtiveram (86%) um segundo resultado negativo em amostra coletada pelo menos 30 dias após. Portanto, observa-se que algumas pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 podem não produzir anticorpos ou gerar níveis indetectáveis de anticorpos reativos às proteínas S1 e N (Krishna et al., 2021).

Pelo exposto, o objetivo deste estudo foi identificar os fatores de risco para ser soronegativo após primeira infecção por SARS-CoV-2 em uma população de recuperados da COVID-19.

Método

Um estudo longitudinal prospectivo, descritivo, com caráter analítico, realizou-se em dois hospitais públicos de alta complexidade da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. Entre agosto de 2020 e junho de 2021, recrutaram-se indivíduos, com mais de 18 anos de idade, atendidos em ambulatórios para pacientes recuperados da COVID-19. O ingresso ao ambulatório ocorreu por encaminhamento do médico assistente após a alta hospitalar, por demanda espontânea ou após convite por contato telefônico da equipe desta pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807).

Na primeira consulta, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os participantes preencheram um questionário sobre as características sociodemográficas, sintomas, comorbidades, necessidade de internamento e foram submetidos à coleta de sangue periférico. Aqueles sem resultados de RT-PCR ou com resultado negativo para SARS-CoV-2 foram excluídos, assim como as amostras de indivíduos vacinados para COVID-19.

Todos os testes de RT-PCR para detecção do RNA do SARS-CoV-2, realizados em amostras de swab nasofaríngeo, foram analisados no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE).

Dividiram-se os indivíduos em dois grupos: soropositivo, definido como aquele em que os participantes apresentaram pelo menos uma amostra positiva; e soronegativo, definido como aquele em que os participantes apresentaram todas as amostras negativas. A persistência de anticorpos IgG-S1 foi avaliada em três períodos após o início dos sintomas: até 90 dias, entre 91 e 180 dias, após 180 dias. Dos 238 indivíduos incluídos no estudo, 87 forneceram duas ou mais amostras. Excluíram-se da análise os pacientes que forneceram apenas uma amostra, a fim de garantir mais precisão e segurança na definição de um indivíduo como soronegativo. Os pacientes hospitalizados com suporte de oxigenioterapia receberam glicocorticóides, como dexametasona 6 mg por dia ou qualquer outro correspondente a essa dose.

Para a verificação da presença sérica de IgG-S1, utilizou-se um kit de Ensaio Imunoenzimático Ligado a Sorbente (ELISA) da Euroimmun anti-SARS-CoV-2 (Lubeck, Alemanha), um dos primeiros ensaios de diagnóstico com a marca Conformidade Europeia desenvolvido e disponível em todo o mundo. O princípio desta metodologia é quantificar IgG específica à proteína pico 1 (S1) do SARS-CoV-2 por um ensaio imunoenzimático, em que os resultados são apresentados em absorvâncias (densidade óptica). Esse kit demonstrou sensibilidade cumulativa de 82,6% para detecção de IgG-S1 em amostras coletadas após 14 dias do RT-PCR e especificidade de 86,9% (Gedeezha et al., 2020). Para execução do teste, seguiram-se as instruções do fabricante. O ensaio semiquantitativo dos resultados foi pela razão entre o valor da absorvância da amostra do paciente pelo valor da absorvância do calibrador. Resultados $\geq 1,1$ foram considerados positivos para a presença de IgG-S1.

Análise estatística

Na análise estatística, utilizaram-se os Softwares SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. O Teste Exato de Fisher foi conduzido para identificar diferenças significativas para variáveis categóricas entre os grupos. Todos os testes foram

bilaterais com um nível de 0,05. Os dados em falta foram excluídos para análise. Calculada a razão de chances – Odds ratio (OR) com Intervalo de Confiança.

As variáveis incluídas na análise foram as seguintes: hospitalização, sexo, idade, ausência de sintomas, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), obesidade (índice de massa corpórea ≥ 30), tabagismo, tempo de coleta das amostras até 90, 91-180 e após 180 dias.

Os pesquisadores não foram “cegos” ao recrutar os participantes nem na avaliação dos resultados. No entanto, a realização dos ensaios para detecção de IgG-S1 foi totalmente às cegas, visto que a identificação das amostras biológicas não definia a estratificação dos grupos. Apenas a análise final dos dados revelou uma visão global dos resultados. Os potenciais fatores de confusão foram identificados e controlados na análise dos dados.

Resultados

Para o ambulatório de recuperação pós-COVID-19, foram encaminhados 245 indivíduos. Desses, excluíram-se dois diante dos resultados negativos em testes moleculares e cinco por não fornecerem resultados de teste. Portanto, dos 238 restantes, 87 participaram da análise, fornecendo duas ou mais amostras.

A população estudada foi predominantemente do sexo masculino (57,5%) e estava na faixa etária dos 46 aos 59 anos (50,6%). Apresentaram sintomas 98,8% e 46% necessitaram de internação. Quanto às comorbidades, a obesidade e a hipertensão arterial sistêmica foram as mais prevalentes, estando presente em 41 e 45,9% respectivamente. A maioria das amostras analisadas foi coletada até 90 dias após o início dos sintomas (72,8%). Usaram glicocorticóides 48,2% (Tabela 1).

O grupo de soronegativo correspondeu a 9,2% da amostra. Ao comparar o grupo soronegativo com o grupo soropositivo, observou-se que não houve diferença em relação a sexo, idade, comorbidades. Apenas a hospitalização demonstrou diferença entre os grupos. Os indivíduos soronegativos não necessitaram de hospitalização (Tabela 2). Entre os indivíduos soropositivos, apresentaram uma amostra negativa 8,7%, com a segunda ou terceira amostras positivas. O modelo da análise multivariada foi inconclusivo.

Tabela 1 – Características clínicas e biológicas em indivíduos não vacinados recuperados de COVID-19 após a primeira infecção

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	50	57,5
Feminino	37	42,5
Soroconversao*		
Não	8	9,2
Sim	79	90,8
Idade (anos)		
18 a 45	20	23,0
46 a 59	44	50,6
60 ou +	23	26,4
Hospitalização		
Sim	40	46,0
Não	47	54,0
Assintomático		
Sim	1	1,2
Não	86	98,8
Obesidade		
Sim	32	41,0
Não	46	59,0
HAS		
Sim	39	45,9
Não	46	54,1
T2DM		
Sim	18	21,2
Não	67	78,8
Tabagismo		
Nunca fumou	64	84,2
Ativo	5	6,6
Inativo	7	9,2
Uso de glicocorticoide		
Sim	40	48,2
Não	43	51,8
Tempo de coleta das amostras (em dias)		
Até 90 DAS	68	78,2
91 a 180 DAS	10	11,5
> 180 DAS	9	10,3

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; T2DM: diabetes mellitus tipo 2; DAS: dias após início dos sintomas.

Soroconversão*: foram considerados soronegativos os indivíduos com todas as amostras negativas, e soropositivos aqueles com, pelo menos, uma amostra positiva.

Tabela 2 – Características clínicas e demográficas de respondentes sorológicos e não respondentes, não vacinados, após primeira infecção por SARS-CoV-2

	IgG-S1		OR	IC 95 OR	p-valor *
	Soronegativo n (%)	Soropositivo n (%)			
Sexo					
Masculino	5 (10,0)	45 (90,0)	1,00	---	1,000
Feminino	3 (8,1)	34 (91,9)	0,26	0,06 – 1,25	
Idade (anos)					
18-45	4 (20,0)	16 (80,0)	1,00	---	0,209
46 a 59	3 (6,8)	41 (93,2)	0,29	0,06 – 1,46	
60 ou +	1 (4,3)	22 (95,7)	0,18	0,02 – 1,17	
Hospitalização					
Sim	0 (0,0)	40 (100,0)	1,00	---	0,007
Não	8 (17,0)	39 (83,0)	**	**	
Assintomático					
Sim	0 (0,0)	1 (100,0)	**	**	1,000
Não	8 (9,4)	77 (90,6)	1,00	---	
Obesidade					
Sim	2 (6,3)	30 (93,7)	1,00	---	0,460
Não	6 (13,0)	40 (87,0)	2,25	0,42 – 11,94	
HAS					
Sim	3 (7,7)	36 (92,3)	0,68	0,15 – 3,06	0,721
Não	5 (10,9)	41 (89,1)	1,00	---	
T2DM					
Sim	0 (0,0)	18 (100,0)	**	**	0,194
Não	8 (11,9)	59 (88,1)	1,00	---	
Tabagismo					
Nunca fumou	7 (10,9)	57 (89,1)	**	**	0,765
Ativo	0 (0,0)	5 (100,0)	1,00	---	
Inativo	1 (14,3)	6 (85,7)	**	**	
Uso de glicocorticóides					
Sim	1 (2,5)	39 (97,5)	0,13	0,02 – 1,13	0,059
Não	7 (16,3)	36 (83,7)	1,00	---	
Tempo de coleta das amostras (em dias)					
Até 90 dias	5 (7,4)	63 (92,6)	1,00	---	0,166
91 a 180 dias	1 (10,0)	9 (90,0)	1,40	0,15 – 13,39	
> 180 dias	2 (22,2)	7 (77,8)	3,60	0,59 – 22,16	

(*) Exato de Fisher (**) Não calculável; OR: odds-ratio IC: intervalo de confiança

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; T2DM: diabetes mellitus tipo 2; DAS: dias após início dos sintomas.

Discussão

Nesta coorte, constatamos que 9,2% dos participantes foram soronegativos. Os que apresentaram sintomas leves e não demandaram hospitalização foram associados ao desfecho de soronegatividade. Esse achado está em consonância com outros estudos (Gededzha et al, 2021; Johannesen et al., 2021).

Há estudos que relatam uma proporção maior de soronegativos, chegando a 71% (Krishna et al., 2021). Essas discrepâncias podem ser parcialmente explicadas por diferenças na especificidade e sensibilidade dos ensaios utilizados, também por diferenças na concepção e no desempenho dos ensaios semiquantitativos utilizados, incluindo o antígeno alvo e as faixas de sensibilidade analítica, além de variações nas populações estudadas.

Em nossa investigação, a soronegatividade foi definida como a incapacidade de gerar anticorpos em todas as amostras fornecidas pelos indivíduos. A importância dessa rigorosa abordagem ficou evidente ao verificarmos que 8,7% dos indivíduos apresentaram, pelo menos, uma amostra negativa, mas foram capazes de soroconverter em outro momento. Além disso, a análise de múltiplas amostras contribuiu para mitigar possíveis erros relacionados com o kit sorológico.

Não encontramos associação entre obesidade e soroconversão. Entretanto, a obesidade tem sido descrita como fator de risco para soronegatividade, pois promove inflamação persistente e desregulação do sistema imune (Johannesen et al., 2021). Por outro lado, a obesidade é um fator de risco para hospitalização por COVID-19, sendo fortemente associada a soropositividade em nossa pesquisa (Ho et al., 2020; Paravidino et al., 2021).

Embora a deficiência de resposta imunológica a novos antígenos entre os idosos seja conhecida, e a resposta de anticorpos na infecção por SARs-CoV-2 esteja associada à idade, não houve diferença na frequência de casos soronegativos entre as faixas etárias em nossa análise (Yang et al., 2021).

Na COVID-19 grave, a dexametasona mostrou benefícios quando administrada após sete dias do início dos sintomas (Horby et al., 2021). Embora o uso de glicocorticoides tenha sido frequente nos participantes da amostra, não houve impacto na soroconversão. Apesar dos glicocorticoides reduzirem a atividade de células B e T, evidências indicam que seu uso não retarda a resposta de anticorpos em pacientes hospitalizados com COVID-19 (Mühlemann et al., 2021).

As principais limitações do estudo foram o reduzido número de participantes, o que impactou na análise multivariada, e a impossibilidade de fazer o estudo de fatores genéticos. Apesar dessa limitação, foi possível concluir que há indivíduos que não desenvolvem anticorpos após infecção por SARS-CoV-2, e houve uma forte tendência indicando que um fator de risco para a ausência de soroconversão é a forma leve da COVID-19.

REFERÊNCIAS

GALLAIS, F. et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine**, v. 71, p. 103561, setembro 2021.

GEDEDZHA, M. P. et al. Performance of the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. **PLoS One**, v. 16, n. 6, junho 2021.

GUDBJARTSSON, D. F. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1724-1734, outubro 2020.

HO, J.S.Y.; FERNANDO, D. I.; CHAN, M. Y.; SIA, C. H. in Covid-19: A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of the Academy of Medicine**, Singapore, v. 49, n. 12, p. 996-1008, dezembro 2020.

HORBY, P. et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. **New England Journal Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693-704, fevereiro 2021.

JOHANNESSEN, C. K. et al. Risk factors for being seronegative following SARS-CoV-2 infection in a large cohort of health care workers in Denmark. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p 1-7, outubro 2021.

KRISHNA, B. A. et al. Evidence of previous SARS-CoV-2 infection in seronegative patients with long Covid. **EBioMedicine**, v. 81, p. 104129, p. 1-14, julho 2022.

LONG, Q. X.. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with Covid-19. **Nature Medicine**, v. 26, p. 845-848, junho 2020.

LUMLEY, S. F. et al. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 6, p. 533-540, fevereiro 2021.

L'HUILLIER, A. G. et al. Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection among hospital workers: a prospective longitudinal study. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 784.e1-784.e8, janeiro 2021.

MÜHLEMANN, B. et al. Impact of dexamethasone on SARS-CoV-2 concentration kinetics and antibody response in hospitalized Covid-19 patients: results from a prospective observational study. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 10, p. 1520.e7-1520.e10, outubro 2021.

PARAVIDINO, V. B. et al. Association between obesity and Covid-19 mortality and length of stay in intensive care unit patients in Brazil: a retrospective cohort study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 13737, agosto 2022.

YANG, H. S. et al. Association of age with SARS-CoV-2 antibody response. **JAMA**, v. 4, n. 3, março 2021.

CONCLUSÕES

- No grupo de hospitalizados, indivíduos do sexo masculino, pessoas com mais de 60 anos de idade com comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus apresentando febre, tosse e dispneia foram frequentes. Já no grupo com COVID-19 leve, sintomas como alteração de olfato ou paladar, dor de garganta e cefaleia foram significativamente mais frequentes.
- Os fatores associados ao nível sérico de anticorpos IgG-S1 anti-SARS-CoV-2 foram hospitalização, idade, número de sintomas no momento do diagnóstico e o tempo de coleta das amostras após início dos sintomas. A gravidade da COVID-19 manifestou o maior coeficiente de regressão. Estima-se que a necessidade de hospitalização aumente, em média, os títulos séricos de IgG-S1 em 2,91 unidades.
- Observou-se a queda dos títulos séricos de IgG-S1 tanto no grupo com COVID-19 leve quanto no grupo com COVID-19 grave, apesar da persistência do IgG-S1 durante o período de seguimento do estudo.
- Não houve diferença entre as amostras dos participantes que receberam suporte de oxigenioterapia invasiva e não invasiva em todos os intervalos de dias após o início dos sintomas analisados.
- Encontrou-se uma fraca correlação do aumento da idade com a elevação de títulos séricos de IgG-S1.
- Constatou-se maior probabilidade de persistência de anticorpo IgG-S1 ao longo do tempo entre as amostras de indivíduos hospitalizados comparadas com as amostras dos participantes não hospitalizados.
- Maiores níveis de IgG-S1 encontraram-se nas amostras coletadas até 90 dias do início dos sintomas comparando-se com amostras coletadas após 90 dias e 180 dias do início dos sintomas.
- Apresentar COVID-19 leve, sem necessidade de hospitalização, foi o único fator associado a ausência de soroconversão.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120-128, julho 2020.

AIELO, A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2247, setembro 2019.

ALWANI, M., et al. Sex-based differences in severity and mortality in Covid-19. **Revista Med. Virol.**, v. 31, n. 6, novembro de 2021.

ARENTZ, M. et al. Characteristics and Outcomes of 21 Critically Ill Patients With Covid-19 in Washington State. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1612 – 1614, abril 2020.

BERGAMASCHI, L. et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8 T cell activation and early immune pathology distinguish severe Covid-19 from mild disease. **Immunity**, v. 54, n. 6, p. 1257-1275, junho 2021.

BILALOGLU, S et al. Thrombosis in Hospitalized Patients With Covid-19 in a New York City Health System. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 799-801, agosto 2020.

BOSCOLO-RIZZO, P. et al. Evolution of Altered Sense of Smell or Taste in Patients With Mildly Symptomatic Covid-19. **JAMA Otolaryngology-- head & neck surgery**, v. 146, n. 8, p. 729-732, julho 2020.

CASCELLA, M. et al. Features, evaluation, and treatment of coronavirus. [Updated 2020 Oct 4]. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; 2020 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776>.

CERVIA, C. et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe Covid-19. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 2, p. 545-557, fevereiro 2021.

CHANSAENROJ J., et al. Long-term persistence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike protein-specific and neutralizing antibodies in recovered Covid-19 patients. **PLoS ONE**, v. 17, n. 4, p. 1-16, abril 2022.

COHEN K. W. et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 100354, p. 1-29, julho 2021.

COVID-19 COMMUNITY RESEARCH PARTNERSHIP STUDY GROUP. Duration of SARS-CoV-2 sero-positivity in a large longitudinal sero-surveillance cohort: the Covid-19 Community Research Partnership. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 889, agosto 2021.

CROSSLEY, B. M. et al. Identification and characterization of a novel alpaca respiratory coronavirus most closely related to the human coronavirus 229E. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3689-3700, dezembro 2012.

DAN, J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. **Science**, v. 371, n. 6529, p. 1-22, fevereiro 2021.

DARYABOR, G. et al. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system. **Frontiers Immunology**, v. 11, n. 1582, p. 1-22, julho 2020.

DAVIS, H. E. et al. Characterizing long Covid in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. **EClinicalMedicine**, v. 38, n. 101019, p. 1-19, julho 2021.

DOWELL, A. C., et al. Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection. **Nature Immunology**, v. 23, n. 1, p. 40-49, janeiro 2022.

DYKEMA, A. G. et al. Functional characterization of CD4⁺ T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 10, maio 2021.

EL-SAYED MOUSTAFA, J.S. et al. ACE2 expression in adipose tissue is associated with cardio-metabolic risk factors and cell type composition—implications for COVID-19. **International Journal of Obesity**, v. 46, p. 1478–1486, maio 2022.

ESPER, F. et al. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 492-498, fevereiro 2005.

FAIR Health. Patients Diagnosed with Post-Covid Conditions: an analysis of private healthcare claims using the official ICD-10 Diagnostic Code, <http://resource.nlm.nih.gov/9918504887106676>. Acesso em: 29 mar. 2024.

FIGUEIREDO-CAMPOS, P. et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Covid-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset. **European Journal of Immunology**, v. 50, n. 12, p. 2025-2040, dezembro 2020.

FRASCA, D. et al. Influence of obesity on serum levels of SARS-CoV-2-specific antibodies in Covid-19 patients. **PLoS One**, v. 16, n. 3, p. 1-16, março 2021.

FROBERG, J. et al. SARS-CoV-2 mucosal antibody development and persistence and their relation to viral load and Covid-19 symptoms. **Nature Communications**, v. 12, n. 5621, setembro 2021.

GAEBLER, C. et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. **Nature**, v. 591, n. 7851, p. 639-644, março 2021.

GALLAIS, F. et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine**, v. 71, p. 1-11, agosto 2021.

GALVÁN, C et al. Classification of the cutaneous manifestations of Covid-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. **The British Journal of Dermatology**, v. 183, n. 1, p. 71-77, julho 2020.

GE, J. et al. Antibody neutralization of SARS-CoV-2 through ACE2 receptor mimicry. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 250, janeiro 2021.

GEDEDZHA, M. P. et al. Performance of the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 Elisa Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. **PLoS One**, v. 16, n. 6, p. 1-14, junho 2021.

GIAGULLI, V. A. et al. Worse progression of Covid-19 in men: is testosterone a key factor? **Andrology**, v. 9, n. 1, p. 53-64, janeiro 2021.

GILBERT, P. B. et al. A Covid-19 Milestone Attained - a correlate of protection for vaccines. **The New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 24, p. 2203-2206, dezembro 2022.

GRAU-EXPÓSITO, J., et al. Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-17, maio 2021.

GRIFONI, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with Covid-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501, junho 2020.

GUAN, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science**, v. 302, p. 276-278, outubro 2003.

GUDBJARTSSON, D. F. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1724-1734, outubro 2020.

HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe Covid-19 patients. **Science**, v. 369, p. 718-724, agosto 2020.

HU, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. 1-27, novembro 2017.

HUANG, I.; LIM, M. A.; PRANATA, R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in Covid-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 395-403, julho 2020.

HUANG, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for Covid-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141, agosto 2020.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713-1716, março 2003.

IMAI, K. et al. Antibody response patterns in Covid-19 patients with different levels of disease severity in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 5, p. 3211-3218, maio 2021.

JOHANNESSEN, C. K. et al. Risk factors for being seronegative following SARS-CoV-2 infection in a large cohort of health care workers in Denmark. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 2, p 1-7, outubro 2021.

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8399-8404, maio 2013.

JUNG, J. H. et al. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in Covid-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, junho 2021.

KLEIN, S. L. et al. Sex, age, and hospitalization drive anti-body responses in a Covid-19 convalescent plasma donor population. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 11, p. 6141-6150, novembro 2020.

KOWITDAMRONG, E. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. 1-11, outubro 2020.

KREER, C. et al. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from Covid-19 patients. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 843-854, agosto 2020.

LAING, A.G. et al. A dynamic Covid-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623-1635, agosto 2020.

LAM, J. H. et al. B cell activation and response regulation during viral infections. **Viral Immunology**, v. 33, n. 4, p. 294-306, abril 2020.

LAMPASONA V. C. et al. Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study. **Diabetologia**, n. 63, p. 2548-2558, 2020.

LEE, C.Y. et al. Serological Approaches for Covid-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. **Frontier Immunology**, v. 11, p. 879, abril 2020.

L'HUILLIER, A.G. et al. Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection among hospital workers: a prospective longitudinal study. **Clinical Microbiology and Infection**, May 2021 784.e1-784.e8v. 27, n. 5, p. 784.e1-784.e8, janeiro 2021.

LI, L. et al. Characteristics and serological patterns of Covid-19 convalescent plasma donors: optimal donors and timing of donation. **Transfusion**, v. 60, n. 8 p. 1765-1772, julho 2020.

LONG, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with Covid-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, abril 2020.

LUMLEY, S. et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 6, p. 533-540, dezembro 2020.

LUSTIG, Y. et al. Existence of immunological memory response in true sero-negative individuals post Covid-19 molecular diagnosis. **Clinical infectious diseases**, ciac196, p. 1-15, março 2022.

McCALLUM, M. et al. Structural basis of SARS-CoV-2 Omicron immune evasion and receptor engagement. **Science**, v. 375, n. 6583, p. 864-868, fevereiro 2022.

McDADE, T. W. et al. Durability of antibody response to vaccination and surrogate neutralization of emerging variants based on SARS-CoV-2 exposure history. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-6, agosto 2021.

MANOHARAN, S.; YING, L. Y. Epstein Barr Virus Reactivation during Covid-19 Hospitalization Significantly Increased Mortality/Death in SARS-CoV-2(+)/EBV(+) than SARS-CoV-2(+)/EBV(-) Patients: a comparative meta-analysis. **International Journal of Clinical Practice**, v. 2023, p. 1-8, janeiro 2023.

MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of Covid-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1-18, setembro 2020.

MEADE, P. et al. Influenza virus infection induces a narrow antibody response in children but a broad recall response in adults. **mBio**, v. 11, n. 1, p. 1-15, janeiro 2020.

MELZI, R. et al. Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study. **Diabetologia**, v. 63, n. 12, p. 2548-2558, dezembro 2020.

MICHELEN, M. et al. Characterising long term Covid-19: a living systematic review. **BMJ Global Health**, v. 6, n. 9, setembro 2021.

MIYARA, M. et al. Immunity to common cold human coronaviruses induces a recall-type igitg pré-covid-19 Response to SARS-CoV-2 antigens without cross-neutralisation. **Frontiers Immunology**, v. 13, n. 790334, p. 1-10, fevereiro 2022.

MOOG, C. et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 1, p. 46-56, janeiro 2014.

MÜLLER, M. A. et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983-1997. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2093-2095, dezembro 2014.

OLIVAL, K. J.; WEEKLEY, C. C.; DASZAK, P. Are bats really “special” as viral reservoirs? What we know and need to know. In: WANG, L.-F.; COWLED, C. (Ed.), **Bats and viruses: a new frontier of emerging infectious diseases**. New Jersey, USA: John Wiley and Sons, p. 281-294, setembro 2015.

ONYANGO, T. B., et al. SARS-CoV-2 specific immune responses in overweight and obese Covid-19 patients. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. 1287388, p. 1-11, novembro 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Covid-19**: weekly epidemiological update, Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/Covid19/deaths?n=c>. Acesso em: 10 mar. 2024.

OMS. **WHO/2019-nCoV/Post_Covid-19_condition/Clinical_case_definition/2021.1**. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_Covid-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1. Acesso em: 29 mar. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO timeline-Covid-19**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---Covid-19>. Acesso em: 2 mar. 2024.

PALM, A. E. et al. Remembrance of things past: long-term B cell memory after infection and vaccination. **Frontier Immunology**, v. 10, n. 1787, julho 2019.

PIJLS, B. G. et al. Temporal trends of sex differences for Covid-19 infection, hospitalisation, severe disease, intensive care unit (ICU) admission and death: a meta-analysis of 229 studies covering over 10M patients, **F1000Research**, v. 11, n. 5, p. 1-16, janeiro 2022.

POLACK, F. P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603-2615, dezembro 2020.

PROAL, A. D.; VANELZAKKER, M. B. Long Covid or post-acute sequelae of Covid-19 (PASC): an overview of biological factors that may contribute to persistent symptoms. **Frontiers. Microbiology**, v. 12, n. 698169, p. 1-24, junho 2021.

RECOVERY Collaborative Group. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with Covid-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. **Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2049-2059, maio 2021.

REN, L. et al. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in Covid-19. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, dezembro 2020.

RENTZ-POLSTER, H. et al. The pathobiology of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: the case for neuroglial failure. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, n. 888232, p. 1-27, maio 2022.

ROBBIANI, D. F. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 437-442, junho 2020.

ROLTGEN, K. et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. **Science Immunology**, v. 5, n. 54, p. 1-19, dezembro 2020.

ROSATI, M. et al. Sequential analysis of binding and neutralizing antibody in covid-19 convalescent patients at 14 months after SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 793953, p. 1-9, novembro 2021.

SAGAR, M et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe covid-19. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, p. 1-5, janeiro 2021.

SCHÄFER, A. et al. Antibody potency, effector function, and combinations in protection and therapy for SARS-CoV-2 infection in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, p. e20201993, março 2021.

SCHALLER, T. et al. Postmortem examination of patients with covid-19. **Jornal da Associação Médica Americana**, v. 323, n. 24, p. 2518-2520, junho 2020.

SCHURZ, H. et al. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. **Human Genomics**, v. 13, n. 2, janeiro 2019.

SEOW, J. et al. Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1598-1607, dezembro 2020.

SHERINA, N. et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent covid-19 patients 6-8 months after the infection. **Med**, New York, v. 2, n. 3, p. 281-295, março 2021.

SILVA, M. J. A. et al. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: a systematic review. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 1001198, p. 1-25, outubro 2022.

SONG, F. et al. Emerging 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia. **Radiology**, v. 295, n. 1, p. 210-217, abril 2020.

SPUDICH, S. E NATH, A. Nervous system consequences of covid-19. **Science**, v. 375, n. 6578, p. 267-269, janeiro 2022.

STERLIN, D. et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 577, janeiro 2021.

STOKES, E. K. et al. Coronavirus disease 2019 case surveillance – United States, Januaryay 30 22-May 30, 2020. **MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n 24, p. 759-765, junho 2020.

SU, S. et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, p. 490-502, março 2016.

SU, Y. et al. Multiple early factors anticipate post-acute covid-19 sequelae. **Cell**, v. 185, n. 5, p. 881-895.e20, março 2022.

TIAN, X. et al. Persistence of the SARS-CoV-2 Antibody response in asymptomatic patients in correctional facilities. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 789374, p. 1- 7, novembro 2021a.

TIAN, X. et al. Potent and persistent antibody response in covid-19 recovered patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 659041, maio 2021b.

TONG, J.Y. et al. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 163, n. 1, p. 3-11, julho 2020.

VAN DER HOEK, L. et al. Identification of a new human coronavirus. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 368-373, abril 2004.

VLASOVA, A. N. et al. Novel canine coronavirus isolated from a hospitalized patient with pneumonia in East Malaysia. **Clinical infectious diseases**, v. 74, n. 3, p. 446-454, fevereiro 2022.

WANG, D. et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 232, n. 11, p. 1061-1069, março 2020.

WANG, C. et al. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1715, março 2021.

WANG, K. et al. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 3, p. 531-539, agosto 2021.

WHEATLEY, A. K., et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate covid-19. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1 – 11, fevereiro 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 15 out. 2023.

WRAPP, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260-1263, março 2020

WOO, P. C.; LAU, S. K.; HUANG, Y.; YUEN, K. Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1117–1127, outubro 2009.

WOODRUF, M. C. et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in covid-19. **Nature Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1506-1516, dezembro 2020.

WU, J. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic covid-19. **Nature Commun**, v. 12, n. 1, p. 1813, março 2021.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 232, n. 13, p. 1239-1242, fevereiro 2020.

ZENG, C. et al. SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 1, p. 1-12, 4 janeiro 2022.

ZHAI, B. et al. SARS-CoV-2 antibody response is associated with age and body Mass Index in convalescent outpatients. **Journal of Immunology**, v. 208, n. 7, p. 1711-1718, abril 2022.

ZHANG, J., et al. Covid-19 reinfection in the presence of neutralizing antibodies. **National Science Review**, v. 8, n. 4, janeiro 2021.

ZHANG, Q., et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening covid-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. 1-14, outubro 2020.

ZIAUDDEEN, N. et al. Characteristics and impact of long covid: findings from an online survey. **PLoS ONE**, v. 17, n. 3, p. 1-28, março 2022.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar da Pesquisa **Avaliação da cinética de anticorpos específicos ao SARS-COV-2 de acordo com a gravidade da COVID-19 em pacientes atendidos na região metropolitana do Recife, Pernambuco**, sob a responsabilidade da pesquisadora Marta Iglis de Oliveira. Esta pesquisa pretende entender o comportamento dos anticorpos na COVID-19 leve e grave. Sua participação é muito importante, pois, como portador de covid-19, o (a) Sr (a) possui células e anticorpos que reconhecem o vírus (resposta imune). Dessa forma, sua participação nos ajudará a entender a doença trazendo benefício para outros pacientes, que, porventura, apresentarem a infecção por COVID-19. Sua participação neste trabalho é voluntária e será deste modo:

(1) Permitir a coleta de até 5 ml de sangue periférico por um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo o material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). O sangue será utilizado para estudar a cinética de anticorpos.

(2) frequentar o ambulatório de pacientes recuperados da COVID-19

(3) Permitir o acesso às informações de seu prontuário.

(4) Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

É importante você saber que um pouco da amostra de sangue será armazenada a 70°C para utilização em pesquisas futuras. Essas amostras serão utilizadas nas pesquisas futuras a fim de realizar novos estudos que complementem os objetivos aqui propostos e fechar as “lacunas” no entendimento das respostas imunológicas de pessoas infectadas por covid-19. Dessa forma, se no futuro sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato a fim de preencher outro TCLE. Informações sobre o andamento e os resultados das pesquisas podem ser fornecidas ao (a) Sr. (Sra) quando desejar, pelo modo de contato conosco, disponibilizado no fim deste documento.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, e o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o Sr (Sra) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre a infecção pelo novo coronavírus e resposta imune diante do covid-19. Caso o(a) Sr(a) não aceite participar da pesquisa, o seu atendimento e cuidados no hospital continuarão normalmente.

Rubrica do participante: _____

Rubrica do pesquisador responsável: _____

Se o(a) Sr.(a) já estiver participando e desistir, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes, seja depois da coleta dos dados, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo à sua pessoa. A retirada da autorização de guarda da sua amostra armazenada será realizada após a assinatura do documento de solicitação da retirada, com validade a partir da data da comunicação de sua decisão.

O(a) Sr.(a) não terá nenhuma despesa nem receberá nenhuma remuneração. No entanto, caso tenha qualquer necessidade por alguma despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento pelo grupo de pesquisa. De igual maneira, se ocorrer algum dano decorrente da sua participação no estudo, será devidamente indenizado(a) judicialmente.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço telefone (81) 996441438 ou e-mail: mariglis@hotmail.com a pesquisadora Marta Iglis de Oliveira.

Consentimento Pós-Informação

Eu fui informado(a) sobre o que o pesquisador quer fazer e por que precisa de minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada, e posso sair do projeto quando quiser.

Este documento é emitido em duas vias. Ambas serão assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando cada um com uma via.

Data:

Assinatura do participante:
Ou impressão digital:

Marta Iglis de Oliveira

Pesquisadora Responsável

Telefone (81) 996441438

E-mail: mariglis@hotmail.com

APÊNDICE B - Ficha de coleta

	FICHA NÚMERO:
NOME:	PRONTUÁRIO:
HOUE INTERNAMENTO: SIM NÃO	DURAÇÃO DO INTERNAMENTO:
DATA DA ADMISSÃO:	TELEFONE/ZAP:
DATA DA ALTA:	DATA DO ÓBITO:

EXAME PARA COVID-19	DATA	RESULTADO
PCR EM SWAB NASAL E OROFARINGE		
SOROLOGIA		

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E COMORBIDADES DE PACIENTES COM COVID-19

SEXO				SIM	NAO
IDADE			DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA		
	SIM	NÃO	NEOPLASIA		
TABAGISTA ATIVO			OBESIDADE		
T2DM			HIV		
HAS			TRANSPLANTADO		
Doença cardiovascular			USO DE MEDICAÇÃO IMUNOSSUPRESSORA		
Doença pulmonar obstrutiva crônica					
OUTRAS COMORBIDADES PULMONARES					

SINAIS E SINTOMAS NA ADMISSÃO HOSPITALAR

	SIM	NÃO			
FEBRE			DIA DO INÍCIO DOS SINTOMAS		
TEMP. MAIS ALTA <37,3 37,3-38 38.1-39 >39			DIA DO INÍCIO DOS SINTOMAS ATÉ A DISPNEIA		
TOSSE			FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA		
EXPECTORAÇÃO				SIM	NAO
FADIGA OU MIALGIA			SUPORTE DE OXIGENIO		
CEFALEIA			UTI		
DISPNEIA			VENTILACAO MECANICA (VM)		
DIARREIA			DIAS NA VM		
HEMOPTOICOS					

ANTICORPO IgG-S1

	1.^a amostra	2.^a amostra	3.^a amostra
Dias após início dos sintomas			
IgG-S1			

APÊNDICE C – Versão do artigo 1 publicado em inglês

A stronger antibody response in increased disease severity of SARS-CoV-2

Marta Iglis de Oliveira, Melayne Rocha Aciole, Patrícia Areias Feitosa Neves, Vitor Palmares Oliveira e Silva, Marcelo Palmares Oliveira e Silva, Virginia Maria Barros de Lorena and Paulo Sérgio Ramos de Araújo.

Corresponding authors

Correspondence to Paulo Sérgio Ramos de Araújo (psergiora@gmail.com)

Department of Tropical Medicine, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil Abstract

Abstract

Background: An assessment of the factors that interfere with serum levels and the persistence of anti-SARs-CoV-2 IgG antibodies is essential in order to estimate the risk of reinfection and to plan vaccination. We analyzed the impact of the severity of coronavirus disease 2019 (Covid-19) and the clinical and biological factors regarding the persistence of SARs-CoV-2 anti-spike protein (IgG-S) antibodies at 12 months.

Methods

This was an observational, longitudinal study with individuals who had recovered from Covid-19 between August 2020 and June 2021. Peripheral blood samples were collected from volunteers who were hospitalized (SERIOUS Covid-19) and those who required no hospitalization (Covid-19 LIGHT). Samples were grouped according to days after symptom onset: up to 90, between 91 and 180, ≥ 180 days after symptom onset. A semiquantitative test for IgG anti-spike protein S1(IgG-S1) was used.

Results: We analyzed 238 individuals who had recovered from Covid-19, of whom 87 had been hospitalized and 151 had not. They provided 148 and 220 samples, respectively. Among those hospitalized, males (65.5%), volunteers aged over 60 years (41.1%), comorbidities such as arterial hypertension (67.8%) and diabetes mellitus (37.9%) were most frequent. We observed higher median serum IgG-S1 titers among those who had recovered from Covid-19 and had

been hospitalized, at all collection time intervals ($p < 0.001$). We observed a weak correlation of increasing age with humoral IgG-S1 response (Spearman correlation = 0.298). There was a greater probability of IgG-S1 antibody persistence over time among samples from hospitalized individuals compared to samples from non-hospitalized participants ($p = 0.001$).

Conclusion: This study has revealed higher titers and a higher probability of the persistence of IgG-S1 in severe cases after SARS-CoV-2 primary infection in unvaccinated recovered patients. Thus, in this study, the severe clinical presentation of Covid-19 was the main factor influencing serum levels and the persistence of IgG-S1 antibodies in Covid-19.

Keywords: SARS-CoV-2; Covid-19; antibody; longitudinal study.

Background

Since the beginning of the coronavirus disease 2019 (Covid-19) pandemic, efforts have been made to understand the kinetics of the anti-SARS-CoV-2 antibodies, particularly the duration of the levels of the immunoglobulin G (IgG) class, due to its protective role in reinfection^{1, 2, 3}. Two hypotheses are of concern: the first is the decline in serum levels of IgG antibodies over time^{4, 5} and the second is the greater chance of individuals with mild Covid-19 not seroconverting or generating a modest immune response compared to those with severe Covid-19^{6, 7}.

Early studies have suggested a rapid decline in anti-spike IgG antibodies (IgG-S), the protein used by the coronavirus in order to enter cells, within three to six months after infection^{8, 9, 10}. Subsequent data have demonstrated that IgG-S antibodies persist for up to eight months in non-hospitalized individuals.^{11, 12} A prospective cohort with a 13-month follow-up period reported a significant drop in serum levels of IgG-S antibodies, and which occurred faster in males³. In the present study, it was not possible to verify an association with the severity of the disease, since only 4% of the individuals required hospitalization.

More recently, an assessment regarding how these molecules remain in the serum of individuals with the disease suggested that there are two types of anti-SARS-Cov-2 antibodies: antibodies with half-lives after 6 months and antibodies with half-lives for up to 14 months.¹³ Most studies on humoral response in patients with severe Covid-19 have reported an association between disease severity and high antibody titers^{14, 15, 16}. However, the short follow-up periods

of these studies have not enabled the authors to assess the impact of Covid-19 severity on IgG antibodies that persist beyond 120 days.

The aim of this prospective study is to compare the serum levels and the longevity of IgG-S antibodies of individuals with severe and mild Covid-19, and to identify clinical and biological factors that may be associated with the dynamics of IgG-S antibodies in unvaccinated individuals who have recovered from Covid-19, after a primary infection with SARS-CoV-2 within 12 months of follow-up after symptom onset.

Methods

A prospective, descriptive longitudinal study with an analytical feature was conducted in two high-complexity public hospitals in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Between August 2020 and June 2021, individuals were recruited aged over 18 years, who were treated at outpatient clinics for patients, who have recovered from Covid-19. Admission to the outpatient clinic occurred by referral from the attending physician after hospital discharge, by spontaneous demand or after an invitation by telephone contact from the research team. The study was approved by the institutional Ethics Committee of the Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807).

At the first consultation, after signing the informed consent form, participants completed a questionnaire regarding sociodemographic characteristics, symptoms, comorbidities, and the need for hospitalization and were also submitted to peripheral blood collection. Those with no real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) results or with a negative RT-PCR result for SARS-CoV-2 were excluded, as were individuals who had been vaccinated for Covid-19.

All RT-PCR tests for the detection of SARS-CoV-2 RNA, performed with nasopharyngeal swab samples, were analyzed at the Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE).

Individuals were divided into two groups: Severe Cases: defined as those who required hospitalization; and Mild Cases: defined as those that did not require hospitalization. The Severe Cases group was further stratified according to oxygen demand: non-invasive oxygen therapy (nasal catheter and non-rebreathing mask) and invasive (invasive mechanical ventilation). The longevity and serum level of antibodies were assessed at three moments in time after the onset of symptoms: up to 90 days, between 91 and 180 days, after 180 days. Of the 238 individuals included in the study, 145 provided a single peripheral blood sample and 93 provided two or more samples.

For measuring the serum concentration of IgG-S1, the Euroimmun anti-SARS-CoV-2 ensaio imunoenzimático (ELISA) kit (Lubeck, Germany) was used, one of the first diagnostic tests with the EC mark (European Conformity) to be developed, and available worldwide. The principle of this methodology is to quantify specific IgG to protein peak 1 (S1) of SARS-Cov-2 through an immunoenzymatic assay, where the results are presented in absorbance (optical density). This kit demonstrated a cumulative sensitivity of 82.6% for the detection of IgG in samples collected after 14 days of RT-PCR and a specificity of 86.9%.¹⁷ To perform the test, the manufacturer's instructions were followed. The semi-quantitative test of the results was through the ratio between the absorbance level of the patient's sample by the absorbance level of the calibrator (Ratio). Ratio results < 0.8 were negative ≥ 1.1 positive, and ≥ 0.8 and < 1.1 were indeterminate for the presence of IgG-S1.

Statistical Analysis

For the statistical analysis, SPSS 13 (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows was used. The chi-squared test and the Kruskal-Wallis rank sum test were conducted to identify significant differences in the categorical variables between the groups. The Mann-Whitney test was used to compare quantitative data between the groups. All tests were two-tailed with a level of 0.05. Missing data were excluded for analysis. The odds ratio (OR) with a confidence interval was calculated.

The variables included in the univariate analysis were as follows: hospitalization, sex, age, arterial hypertension, type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity, IgG-S1 antibody titers up to 90 days, between 91-180, and after 180 days. Variables that attained a level of $p < 0.2$ in the univariate analysis were entered in a linear regression model using the Enter method.

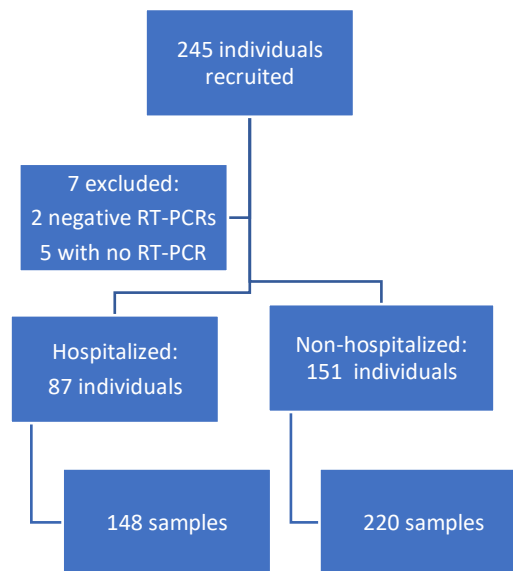
A quality control of the models was performed: the assumption of linearity and the quality of variance of the dependent variable across the range of values of the independent variable were assessed with scatterplots, and the assumption that the dependent variable is normally distributed was assessed with a normal probability plot (data not shown).

The researchers were not blinded when recruiting participants nor when they assessed the results. However, the tests for detecting IgG-S1 were completely blind, since identifying the biological samples did not define the stratification of the groups. Only the final analysis of the data revealed an overview of the results. Potential confounders were identified and controlled in the data analysis.

Results

A total of 245 individuals were referred to the outpatient clinic for those who have recovered from Covid-19, of whom, two were excluded for having presented a negative molecular test, and five were excluded for failing to present test results. Thus, 238 individuals were included in the study, who contributed 368 samples. The 87 participants who had been hospitalized provided 148 peripheral blood samples and the 151 participants who had not been hospitalized provided 220 peripheral blood samples over 386 days after symptom onset (Figure 1).

Figure 1. Screening, Enrollment and Stratification n at 386 days after primary infection



Among the recruited, seven were excluded for having presented a negative molecular test or for failing to present test results. 238 participants provided 368 samples over 386 days after symptom onset. RT-PCR denotes Real-time polymerase chain reaction.

Clinical and biological characteristics of individuals recovered from Covid-19 according to hospitalization (Table 1)

The most frequently hospitalized patients were male (65.5%, $p=0.01$). In the hospitalized group, 36 (41.1%) patients were aged 60 years or older (<0.001). Among the 151 non-hospitalized participants, symptoms such as smell or taste changes, sore throat and headache were significantly more frequent. On the other hand, fever, cough and dyspnea were more common in the hospitalized group.

Table 1. Clinical and biological characteristics of 238 individuals who recovered from Covid-19 according to hospitalization, in 386 days after primary infection

Variables	Hospitalization		OR	CI 95% OR	p-value
	Yes n =87 (%)	No n =151(%)			
Sex					
Male	57 (65.5%)	73 (48.3%)	2.03	1.18 – 3.50	0.010 *
Female	30 (34.5%)	78 (51.7%)	1.00	---	
Ages (in years)					
18 to 45	14 (16.1%)	67 (44.4%)	1.00	---	<0.001 *
46 to 59	37 (42.5%)	65 (43.0%)	2.72	1.35 – 5.50	
≥ 60	36 (41.1%)	19 (12.6%)	9.07	4.07 – 20.19	
Symptoms					
Fever	61 (70.1%)	74 (50.0%)	2.35	1.34 – 4.11	0.003 *
Cough	64 (73.6%)	72 (48.6%)	2.94	1.65 – 5.22	<0.001 *
Dyspnea	74 (85.1%)	46 (31.1%)	12.62	6.37 – 25.03	<0.001 *
No change in sense of smell	48 (55.2%)	49 (33.1%)	2.49	1.14 – 4.28	<0.001 *
Myalgia	40 (46.0%)	74 (50.0%)	0.85	0.50 – 1.45	0.551 *
Asthenia	45 (51.7%)	84 (56.8%)	0.82	0.48 – 1.39	0.454 *
Sore throat	11 (12.6%)	51 (34.5%)	0.28	0.13 – 0.56	<0.001 *
Diarrhea	18 (20.7%)	46 (31.1%)	0.58	0.31 – 1.08	0.084 *
Abdominal pains	10 (11.5%)	19 (12.8%)	0.88	0.39 – 1.99	0.762 *
Headache	28 (32.2%)	100 (67.6%)	0.23	0.13 – 0.40	<0.001 *
No symptoms	0 (0.0)	11 (7.3%)	---	---	---
Comorbidities					
SAH	59 (67.8%)	35 (23.8%)	6.74	3.74 – 12.15	<0.001 *
T2DM	33 (37.9%)	13 (8.8%)	6.30	3.08 – 12.88	<0.001 *
Obesity	38 (46.3%)	50 (36.2%)	1.52	0.87 – 2.64	0.139 *
Oxygen therapy					
Non-invasive	69 (79.3%)	---	---	---	---
Invasive mechanical ventilation	18 (20.7%)	---	---	---	---
Time in ICU	29 (33.3%)	---	---	---	---
Distribution of samples					
Up to 90 DASO	72 (48.6%)	75 (34.1%)	---	---	0.003 *
91 to 180 DASO	41 (27.7%)	58 (26.4%)	---	---	-
> 180 DASO	35 (23.6%)	87 (39.5%)	---	---	-
Presence of IgG-S antibody					
Positive	145 (98.0%)	168 (76.4%)	11.22	3.40 – 37.07	<0.001 *
Negative	3 (2.0%)	39 (17.7%)	1.00	---	
Undetermined	0 (0.0)	13 (5.9%)	**	**	

(*) Chi-Squared (**) Incalculable

SAH denotes Systemic arterial hypertension, T2DM Type 2 diabetes mellitus, ICU intensive Care Unit, DASO Days after symptom onset, IgG-S Anti-spike Immunoglobulin G, OR Odds Ratio.

This table shows the frequency of clinical and biological characteristics between hospitalized and non-hospitalized groups. Using Chi-Squared test, significant differences between the groups were identified. We also report the Odds Ratio with a corresponding 95% confidence interval to estimate the chance of each variable occurring in the hospitalized group compared to non-hospitalized group.

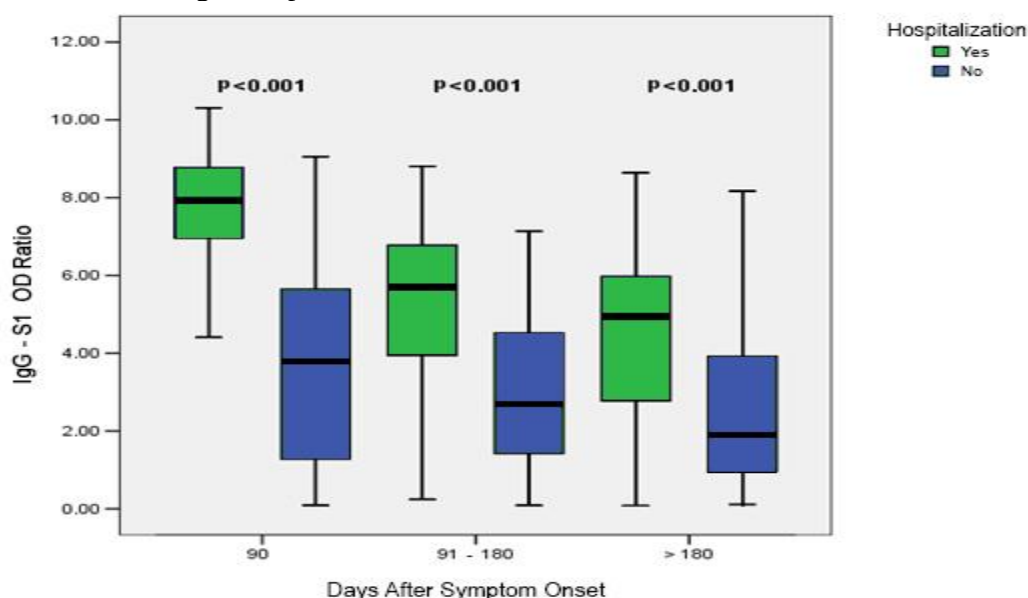
The presence of specific IgG-S1 antibodies against SARS-CoV-2 was verified in 313 samples. Forty-two samples were classified as negative for specific IgG-S1 antibodies against SARS-CoV-2. Of these, 39 samples were from non-hospitalized patients who had recovered and three samples were from hospitalized patients who had recovered.

Comorbidities such as systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus were more prevalent among hospitalized patients ($p < 0.001$). All hospitalized participants had received oxygen therapy. Among these, 69 (79.3%) received non-invasive oxygen therapy and 18 (20.7%) received invasive ventilatory support and 29 (33.3%) were admitted to an intensive care unit.

Factors that impact the response of specific IgG-S1 against SARS-CoV-2

A comparison of the median level of serum IgG-S1 antibodies between samples from the Mild Group and the Severe Group demonstrated higher serum IgG-S1 titers among patients from the Severe Group at all collection times analyzed over the 386 days ($p < 0.001$). On the other hand, a drop in serum IgG-S1 titers was observed in both groups, despite the persistence of IgG-S1 during the follow-up period of the study (Figure 2).

Figure 2. Antibody IgG-S1 serum titers in 238 individuals who recovered from Covid-19 according to hospitalization



Antibody IgG-S1 serum titers in 238 individuals who recovered from Covid-19 according to hospitalization at 386 days after primary infection. A comparison of the median level of serum IgG-S1 antibodies between samples from the Mild Group (blue box) and the Severe Group (green box) demonstrated higher serum IgG-S1 titers among patients from the Severe Group at all collection times analyzed over the 386 days. A drop in serum IgG-S1 titers was observed in both groups during the follow-up period of the study. OD ratio: denotes ratio between the absorbance level of the patient's sample by the absorbance level of the calibrator.

Significantly, higher levels of IgG-S1 were observed in samples collected up to 90 days after symptom onset compared to samples collected 90 days and 180 days after symptom onset (Table 2).

Table 2. Factors that impact the serum level of IgG-S1 antibodies against SARs-CoV-2 in samples of individuals after recovering from the first infection of Covid-19

Variables	IgG Antibody	p-value
	Median (Q1; Q3)	
Hospitalization		
Yes	6.76 (4.98; 8.14)	< 0.001 *
No	2.67 (1.18; 4.74)	
Sex		
Male	4.95 (1.73; 7.33)	0.033 *
Female	3.70 (1.90; 6.07)	
Obesity		
Yes	4.96 (2.49; 6.81)	0.014 *
No	3.62 (1.47; 6.78)	
Symptoms at diagnosis		
1-3	3.92 (1.32; 6.70)	0.026 **
4-5	5.02 (2.67; 7.38)	
≥6	4.16 (1.82; 6.31)	
Age (in years)		
18 to 45	2.20 (1.01; 4.08)	< 0.001 **
46 to 59	5.33 (2.60; 6.98)	
60 or over	5.65 (3.19; 7.45)	
SAH		
Yes	5.85 (3.26; 7.42)	< 0.001 *
No	3.27 (1.42; 5.83)	
T2DM		
Yes	5.97 (3.94; 7.64)	< 0.001 *
No	3.81 (1.58; 6.29)	
IgG antibody titers in DASO		
Up to 90 DASO	6.20 (3.43; 8.08)	< 0.001 **
91 to 180 DASO	3.82 (2.05; 6.10)	
> 180 DASO	2.63 (1.25; 5.01)	

(*) Mann-Whitney (**) Kruskal-Wallis

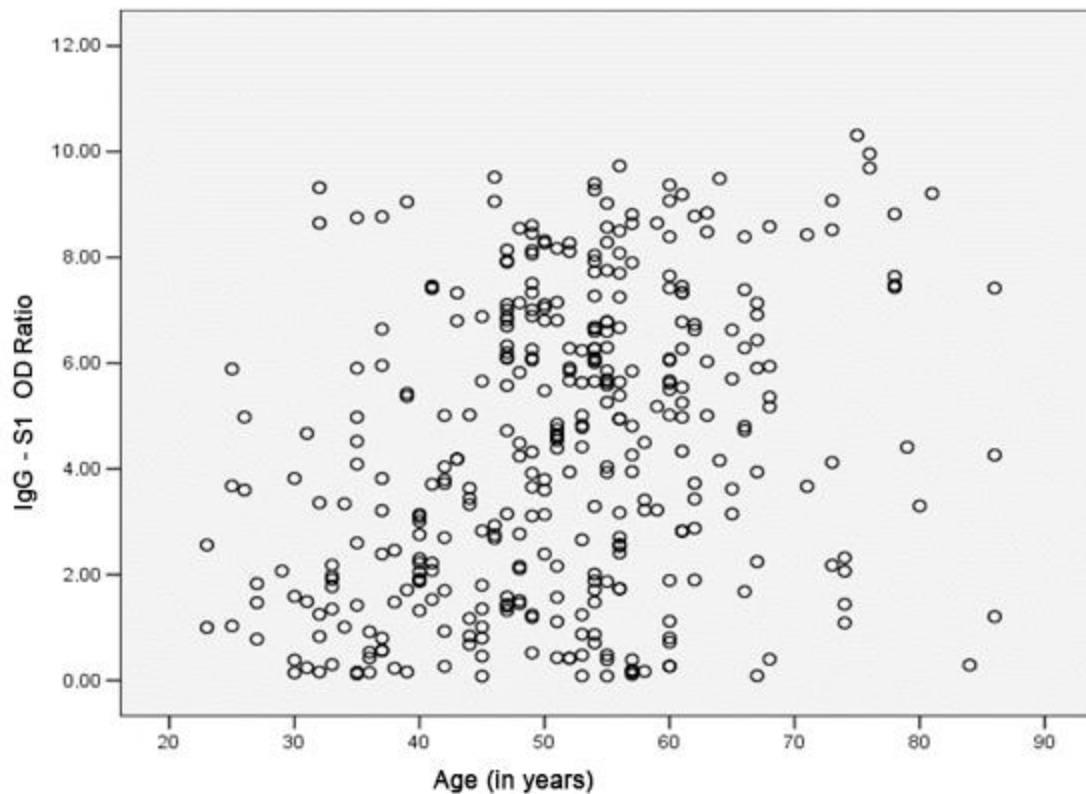
SAH denotes Systemic arterial hypertension, T2DM Type 2 diabetes mellitus, DASO Days after symptom onset, IgG-S Anti-spike Immunoglobulin G.

This tables show the results of Mann-Withney and Kruskal-Wallis to indicate the impact of each variable separately on the serum level IgG-S1 antibodies against SARs-CoV-2.

Higher levels of IgG-S1 were observed in male, obese, hypertensive individuals with T2DM and individuals with four or more symptoms at the time of diagnosing Covid-19 (Table 2). Although there was a weak correlation between increasing age and humoral IgG-S1 response (Spearman correlation= 0.298 (Figure 3), we noted that individuals aged over 45 years

presented significantly higher median levels of IgG-S1 when compared to younger individuals (Table 2).

Figure 3. Spearman correlation coefficient between serum titers according to age = 0.298

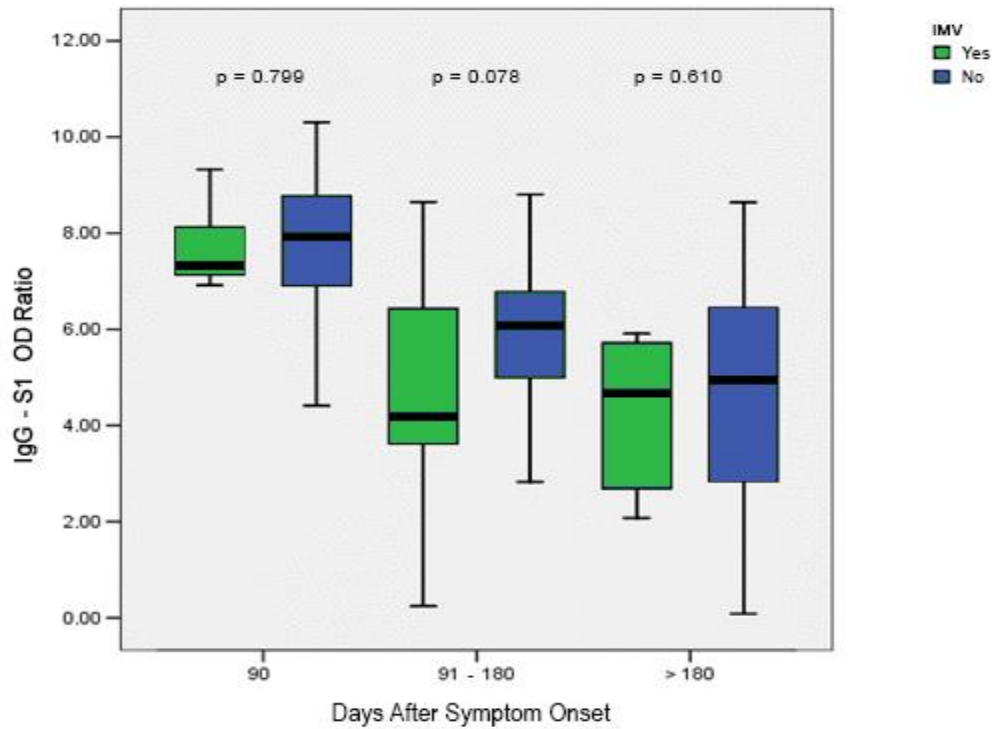


Although there was a weak correlation between increasing age and humoral IgG-S1 response (Spearman correlation= 0.298), we noted that individuals aged over 45 years presented significantly higher median levels of IgG-S1 when compared to younger individuals (Table 2). OD Ratio: denotes ratio between the absorbance level of the patient's sample by the absorbance level of the calibrator.

On the other hand, there was no statistically significant difference between the samples of participants who received invasive and non-invasive oxygen therapy support at all intervals of days after the onset of the analyzed symptoms (Figure 4).

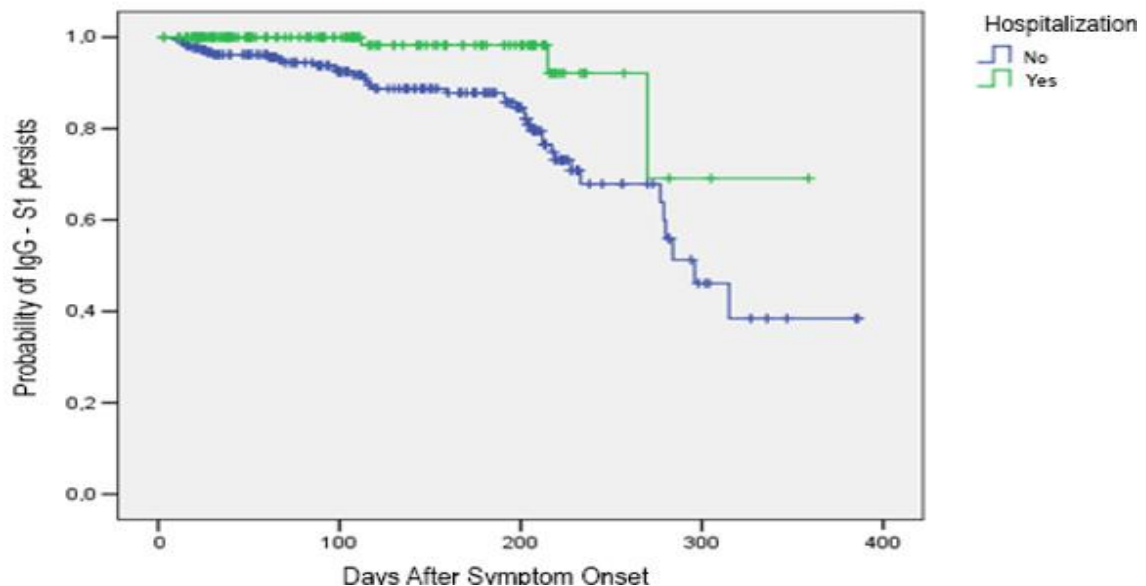
There was a greater probability of IgG-S1 antibody persisting over time among samples from hospitalized individuals when compared to samples from non-hospitalized participants ($p=0.001$) (Figure 5). Samples with IgG-S1 antibody titers below the cut-off point (negative) were more frequent in the non-hospitalized group, in those younger than 60 years and in those with no comorbidities.

Figure 4. Antibody IgG-S1 serum titers in 87 hospitalized individuals who recovered from Covid-19 according to oxygen demand (invasive and non-invasive oxygen therapy)



There was no statistically significant difference between the samples of participants who received invasive and non-invasive oxygen therapy support at all intervals of days after the onset of the analyzed symptoms.

Figure 5. Probability of IgG-S1 antibodies persisting according to severity in 238 individuals who recovered from Covid-19 over 386 days



Kaplan Meier Curve: Log Rank (Mantel-Cox): Chi-Square 10.1575 df 1 $p=0.001$ Testing equality of survival distributions for the different levels of Hospitalization.). There was a greater probability of IgG-S1 antibody persisting over time among samples from hospitalized individuals when compared to samples from non-hospitalized participants ($p=0.001$).

In the multivariate analysis (Table 3), only hospitalization, age, number of symptoms at the time of diagnosis and the time of sample collection after the onset of symptoms continued to impact the humoral response. The severity of Covid-19 manifested the highest regression coefficient. It is estimated that, on average, the need for hospitalization increases the serum IgG-S1 titers by 2.91 units (coefficient 2.91, $p=0.001$).

Table 3 – IgG-S1 antibody model

Variables	Coefficients		p-value
	Unstandardized	Standardized	
Constant	2,41	---	< 0,001
Days after symptom onset	-0,01	-0,24	< 0,001
Age (in years)	0,02	0,09	0,044
Symptoms at diagnosis	0,14	0,10	0,014
Hospitalization	2,91	0,51	< 0,001

Adjusted R Squared: 0.417

This table shows the multivariate analysis that included variables that attained a level of $p < 0.2$ in the univariate analysis. They were entered in a linear regression model using the Enter method.

Variables that began in the model: Sex, Obesity, SAH, T2DM, Hospitalization, Days after symptom onset, Age (in years) and number of symptoms. The severity of Covid-19 manifested the highest regression coefficient. SAH denotes Systemic arterial hypertension, T2DM Type 2 diabetes mellitus, DASO Days after symptom onset.

Discussion

Our results presented higher median IgG-S1 antibody titers in the Severe Group samples in all the studied time intervals. Several studies have previously established the association between the severity of Covid-19 and the magnitude of the humoral response in the first four months after the onset of symptoms.^{14, 15, 16} Our results also demonstrate that this association remains over twelve months. We believe that a higher viral and antigenic load in severe individuals^{18,19, 20} elicit a greater IgG-S1 antibody response and thereby justify the findings of our study. However, it is still controversial as to whether higher viral loads are associated with poorer outcomes in Covid-19.^{21, 22, 23, 24}

In the univariate analysis, hospitalization seemed to have an equal impact as the other variables on serum IgG-S titers. After multivariate analysis, it was observed in the final model that the variable with the greatest influence on the serum level of IgG-S1 antibodies was hospitalization, i.e., the severe presentation of Covid-19.

Despite the persistence of IgG-S1, there was a decrease in the antibody titers in both groups over the follow-up period. A negative association was observed between the variable days after symptom onset and the IgG-S1 antibody levels, suggesting that as time passes, the IgG-S1 antibody titer decreases in peripheral blood. A similar outcome to this has been reported

in other studies.^{13, 25} This dynamic of the humoral response in Covid-19 is analogous to many other viruses, including those that induce lifelong immunity, such as measles, experiencing a contraction phase.^{26, 27}

We observed a higher frequency of seronegativity and a greater probability of seronegativity for IgG-S1 during follow-up in the Mild Group. This finding was also reported by a study, which observed that 40% of asymptomatic individuals and 12% of symptomatic individuals presented with negative serology after a 90-day period.⁶ While it is assumed that the risk of reinfection in this population is higher, it is not possible, however, to draw this conclusion, and more studies are required. A retrospective study reported no difference in the severity of Covid-19 when comparing individuals with the presence of IgG antibodies and individuals with no IgG antibodies.⁸

In our sample, no association was observed between age and serum IgG-S1 titers in the final model. The link between age and antibodies in Covid-19 is controversial. However, advanced age was a predictive factor for hospitalization, in line with a number of other studies.^{29, 30} It is known that immunosenescence promotes quantitative changes in cells and components of the immune system, together with more complex changes in the action of several immune responses. Older people are less able to respond effectively to new antigens, in addition to chronic low-grade inflammation brought about by an increase in the production of pro-inflammatory cytokines, acute-phase proteins and oxidative stressors.³¹

Corroborating our findings, being male has been described as a risk factor for hospitalization,^{32, 33} but without influencing serum antibody titers. Gender differences in the immune response to Covid-19 have been described. Males present a pro-inflammatory response at the expense of IL-6, IL-8, GRO α , sCD4L, MIP-1 β , MCP-1.³⁴ Some studies have demonstrated higher levels of the ACE2 receptor, used for viral entry into target cells, in males. The cellular serine protease TMPRSS2, responsible for activating the spike (S) protein of the coronavirus, is also highly expressed in the prostate epithelium and is sensitive to androgens.³⁵ However, in the present study, no difference was observed in serum IgG-S antibody titers between genders.

As with the variable sex, comorbidities such as SAH and T2DM demonstrated no association with the humoral response after adjusting for the other variables. They were more frequent in the Severe Group, thereby demonstrating a connection with the criticality of Covid-19. The link between SAH and the IgG-S antibody response has not been studied. There is controversy surrounding the hypothesis that hypertension is an independent predictor of severity.³⁶

The combination of SAH with T2DM or another comorbidity may be more relevant as a predictor of severe Covid-19.³⁷ On the other hand, it is well established that T2DM and hyperglycemia increase the chance of hospitalization, but do not represent a decrease in serum levels of IgG-S antibodies after primary infection with SARS-CoV-2,³⁸ which is in agreement with our findings. Individuals with T2DM have an impaired proliferative response of lymphocytes, as well as disorders of the monocytes, macrophages, and neutrophils and in the complement activation.³⁹

In the present study, obesity, after the multivariate analysis, demonstrated no impact on the serum levels of the IgG-S antibody. However, Frasca et al reported lower anti-IgG-S antibody titers in individuals with obesity, and a body mass index negatively associated with serum levels of IgG-S1 antibodies in Covid-19.⁴⁰ These findings are consistent with the knowledge that obesity is associated with chronic low-grade inflammation and, in turn, a dysfunctional immune system.^{41, 42}

Although it is not a viral neutralization test, the semiquantitative Euroimmun IgG-S1 Kit was described as having a strong correlation with the neutralization test.⁴³ It is important to note that the small number of asymptomatic patients was due to the difficulty in finding these patients in the first wave of the pandemic, when tests for Covid-19 were scarce in Brazil and were reserved only for those with symptoms.

Other limitations included the fact that most study subjects only provided a single blood sample, and there was no continuous follow-up. Additionally, the study solely analyzed IgG-S1 antibodies. Due to limited resources, it was not possible to include tests for IgA and IgM antibodies, as well as against targets other than the spike protein.

Conclusions

In sum, this study has revealed higher antibody titers and a higher likelihood of IgG-S persisting in severe cases after SARS-CoV-2 primary infection in unvaccinated patients who have recovered. Thus, in this study, the severe clinical presentation of Covid-19 was the main factor influencing serum levels of IgG-S1 antibodies in Covid-19.

Abbreviations

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome-coronavirus

Covid-19: Coronavirus disease 2019

SARS: Severe acute respiratory syndrome

ARDS: Acute respiratory distress syndrome

IgG: Immunoglobulin G

IgG-S: Anti-spike Immunoglobulin G

RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction

LACEN-PE Central Laboratory of Pernambuco

SAH: Systemic arterial hypertension

T2DM: Type 2 diabetes mellitus

Ethics declarations

1.3.1 Ethics approval and consent to participate

This project was submitted to and approved by the Human Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807) in compliance with the guidelines and regulatory standards for research involving human beings. Individuals who agreed to participate in the study signed an informed consent form.

1.3.2 Consent for publication

Not applicable.

1.3.3 Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interesting

Availability of data and materials

Data are available upon request from the corresponding author.

Funding

This study was funded by the Financial Aid to Researchers project from the Central Administration of Postgraduate Studies at the Universidade Federal de Pernambuco (Number 078608/2020-11)

Author information

Department of Tropical Medicine, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Marta Iglis de Oliveira, Melayne Rocha Aciole, Patrícia Areias Neves Feitosa, Virginia Maria Barros de Lorena and Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil (Fiocruz-PE)

Virginia Maria Barros de Lorena

Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil (Fiocruz-PE).

Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Department of Infectious Diseases, Hospital das Clínicas, Brazilian Company of Hospital Services (EBSERH), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Marta Iglis de Oliveira and Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Recife Medical School, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Vitor Palmares Oliveira e Silva e Marcelo Palmares Oliveira e Silva

Authors' Contributions

MIO conceived the project, wrote the article, and provided outpatient care to individuals who had recovered from Covid-19 and who participated in the study. VPOS and MPOS interviewed and completed a questionnaire. PANF received, identified, processed and stored peripheral blood samples from volunteers in the project collection library. MRA and VMBL processed and performed the enzyme immunoassays. MIO performed the statistical analysis. VMBL and PSRA reviewed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank all the volunteers who agreed to participate in this study and the Central Administration of Postgraduate Studies at the Universidade Federal de Pernambuco.

References

- 1 Long QX et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with Covid-19. **Nat. Med.** 2020;26:845-848.
- 2 Lumley SF et al. Oxford University Hospitals Staff Testing Group. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. **N Engl J Med.**, 2021;384:533-540.
- 3 Gallais F, Gantner P, Bruel T, Velay A, Planas D, Wendling MJ et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine.** 2021;71:103561.
- 4 Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, *et al.* Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. **Nat Microbiol.** 2020;5:1598–1607.
- 5 Covid-19 Community Research Partnership Study Group. Duration of SARS-CoV-2 seropositivity in a large longitudinal sero-surveillance cohort: the Covid-19 Community Research Partnership. **BMC Infect Dis.** 2021;21:889.
- 6 Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nat Med.** 2020;26:1200-1204.
- 7 Kowitdamrong E, Puthanakit T, Jantarabenjakul W, Prompetchara E, Suchartlikitwong P, Putharoen O, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with differing severities of coronavirus disease 2019. **PLoS One.** 2020;15:e0240502
- 8 Figueiredo-Campos P, Blankenhaus B, Mota C, Gomes A, Serrano M, Ariotti S, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in covid-19 patients and healthy volunteers up to 6 months post disease onset. **Eur J Immunol.** 2020;50:2025-2040.

- 9 Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;591:639-644.
- 10 Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. **Science**. 2021;371:6529.
- 11 Sherina N, Piralla A, Du L, Wan H, Kumagai-Braesch M, Andréll J, et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent covid-19 patients 6-8 months after the infection. **Med**. 2021;2:281-295.
- 12 Tian X, Jiang W, Zhang H, Lu X, Li L, Liu W, Li J. Persistence of the SARS-CoV-2 Antibody Response in Asymptomatic Patients in Correctional Facilities. **Front Microbiol**. 2021;12:789374.
- 13 Rosati M, Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Agarwal M, Bear J, Burns R, et al. Sequential Analysis of Binding and Neutralizing Antibody in covid-19 Convalescent Patients at 14 Months After SARS-CoV-2 **Infection**. **Front Immunol**. 2021;12:793953.
- 14 Imai K, Kitagawa Y, Tabata S, Kubota K, Nagura-Ikeda M, Matsuoka M, et al. Antibody response patterns in covid-19 patients with different levels of disease severity in Japan. **J Med Virol**. 2021;93:3211-3218.
- 15 Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. **Sci Immunol**. 2020;5:54.
- 16 Ren L, Zhang L, Chang D, Wang J, Hu Y, Chen H, *et al*. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in Covid-19. **Commun Biol**. 2020;3:780.
- 17 Gededzha MP, Mampeule N, Jugwanth S, Zwane N, David A, Burgers WA, et al. Performance of the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. **PLoS One**. 2021;16:6.
- 18 El Zein S, Chehab O, Kanj A, Akrawe S, Alkassis S, Mishra T et al. SARS-CoV-2 infection: Initial viral load (iVL) predicts severity of illness/outcome, and declining trend of iVL in hospitalized patients corresponds with slowing of the pandemic. **PLoS One**. 2021 Sep 16;16(9):e0255981.
- 19 Tsukagoshi H, Shinoda D, Saito M, Okayama K, Sada M, Kimura H, Saruki N. Relationships between Viral Load and the Clinical Course of Covid-19. **Viruses**. 2021;13:304.
- 20 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**. 2020;11:5493.
- 21 Kim Y, Cheon S, Jeong H, Park U, Ha NY, Lee J, et al. Differential Association of Viral Dynamics With Disease Severity Depending on Patients' Age Group in Covid-19. **Front Microbiol**. 2021;12:712260.
- 22 Abdulrahman A, Mallah S.I. & Alqahtani M. Covid-19 viral load not associated with disease severity: findings from a retrospective cohort study. **BMC Infect Dis**. 2021;21:688.

- 23 Knudtzen FC, Jensen TG, Lindvig SO, Rasmussen LD, Madsen LW, Hoegh SV, et al. SARS-CoV-2 viral load as a predictor for disease severity in outpatients and hospitalised patients with Covid-19: A prospective cohort study. **PLoS One**. 2021;16:10.
- 24 Trunfio M, Calcagno A, Bonora S, Di Perri G. Lowering SARS-CoV-2 viral load might affect transmission but not disease severity in secondary cases. **Lancet Infect Dis**. 2021;21:914-915.
- 25 Peghin M, De Martino M, Fabris M, Palese A, Visintini E, Graziano E, et al. The Fall in Antibody Response to SARS-CoV-2: a Longitudinal Study of Asymptomatic to Critically Ill Patients Up to 10 Months after Recovery. **J. Clin Microbiol**. 2021;59:11.
- 26 Hu Y, Lu P, Deng X, Guo H, Zhou M. The declining antibody level of measles virus in China population, 2009-2015. **BMC Public Health**. 2018;18:906.
- 27 Gibney KB, Attwood LO, Nicholson S, Tran T, Druce J, Healy J, et al. Emergence of Attenuated Measles Illness Among IgG-positive/IgM-negative Measles Cases: Victoria, Australia, 2008-2017. **Clin Infect Dis**. 2020;70:1060-1067.
- 28 Ding J, Liu C, Wang Z, Guo H, Zhang K, Ma L, et al. Characteristics and Prognosis of Antibody Non-responders With Coronavirus Disease 2019. **Front Med**. (Lausanne). 2022;9:813820.
- 29 Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with Covid-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**. 2020;395:1054-1062.
- 30 O'Driscoll M, Ribeiro Dos Santos G, Wang L, Cummings DAT, Azman AS, Paireau J, et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. **Nature**. 2021;590:140-145.
- 31 Aiello A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. **Front. Immunol**. 2019; 10:2247.
- 32 Marina S.; Piemonti L. Gender and age effects on the rates of infection and deaths in individuals with confirmed SARS-CoV-2 **Infection in Six European Countries**. 2020. <https://ssrn.com/abstract=3576790>.
- 33 Islam N. et al. Excess deaths associated with covid-19 pandemic in 2020: age and sex disaggregated time series analysis in 29 high income countries. **BMJ**. 2021;373:n1137.
- 34 Qi S. et al. Sex differences in the immune response to acute Covid-19 respiratory tract infection. **Biol Sex Differ.**, 2021;12, 66.
- 35 Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on Ace2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell.**, 2020;181:271-280.
- 36 Bauer, A. Z. et al. Hypertension, medications, and risk of severe covid-19: a Massachusetts community-based observational study. **J Clin Hypertens**. 2020;23:21-27.
- 37 Sun, Y. et al. Independent and combined effects of hypertension and diabetes on clinical outcomes in patients with covid-19: a retrospective cohort study of Huoshen Mountain Hospital and Guanggu Fangcang Shelter Hospital. **J Clin Hypertens**. 2020; 23:218-231.

- 38 Lampasona, V. et al. Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study. **Diabetologia**, 2020;63:2548-2558.
- 39 Daryabor, G. et al. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system. **Front Immunol.**, 2020;11:1582.
- 40 Frasca, D. et al. Influence of obesity on serum levels of SARS-CoV-2-specific antibodies in covid-19 patients. **PLoS One**, 2021;16:3:e0245424.
- 41 Franceschi, C. et al. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann N Y Acad Sci.**, 2000;908:244-54.
- 42 Mayer-Pickel, K. Obesity and antiphospholipid syndrome: a particular challenge in pregnancy. **Obes. Res. Open J.** 2015; 2: 46-56.
- 43 Montesinos I, Dahma H, Wolff F, Dauby N, Delaunoy S, Wuyts M, et al. Neutralizing antibody responses following natural SARS-CoV-2 infection: Dynamics and correlation with commercial serologic tests. **J Clin Virol.** 2021;144:104988.

APÊNDICE D – Versão do artigo 2 enviado para publicação em inglês

Risk factors for non-seroconversion after the primary SARS-CoV-2 infection

Marta Iglis de Oliveira, Melayne Rocha Aciole, Patrícia Areias Feitosa Neves, Vitor Palmares Oliveira e Silva, Marcelo Palmares Oliveira e Silva, Virginia Maria Barros de Lorena and Paulo Sérgio Ramos de Araújo.

Corresponding authors

Correspondence to Paulo Sérgio Ramos de Araújo (psergiora@gmail.com)

Department of Tropical Medicine, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Abstract

Background: Assessing the factors that impede the seroconversion of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies is crucial for understanding the humoral immune response in Covid-19 and its effectiveness against reinfections, even after vaccination. In this study, we investigated the clinical and biological risk factors associated with the non-seroconversion of IgG antibodies following the primary SARS-CoV-2 infection in unvaccinated individuals.

Methods: This was an observational, longitudinal study, with recovered Covid-19 individuals between August 2020 and June 2021. We analyzed participants who provided multiple peripheral blood samples, categorized by days after symptom onset: up to 90 days, 91 to 180 days, and ≥ 180 days. A semiquantitative test measured IgG antibodies against the spike protein S1 (IgG-S1). Individuals with negative results in all their samples were classified as seronegative.

Results: Among the 87 analyzed individuals who recovered from Covid-19, 8 (9.2%) were seronegative. Interestingly, while there were no significant differences in sex, age, or comorbidities between the seronegative and seropositive groups, a mild presentation of Covid-19 was associated with seronegativity ($p = 0.007$) in the univariate analysis. Notably, all seronegative individuals reported experiencing symptoms, though none required hospitalization.

Conclusion: This study has discovered that developing mild symptoms of Covid-19 was the only identifiable risk factor associated with non-seroconversion after the primary SARS-CoV-2 infection in unvaccinated recovered patients.

Keywords: antibodies; humoral immunity; Covid-19 serodiagnosis; SARS-CoV-2 virus.

Background

Since the emergence of the coronavirus disease 2019 (Covid-19) pandemic, there has been a critical focus on understanding the kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibodies, including the risk factors for non-seroconversion^{1,2}. While most individuals infected with the virus develop detectable antibodies approximately three weeks after infection³, a small percentage, ranging from 1 to 9%, fail to show detectable antibodies during this period^{4,5}.

Another analysis, which used serological tests for IgM, IgG, and IgA immunoglobulins (pan-Ig) against both the nucleocapsid protein and the receptor-binding domain of the S1 subunit of the spike protein, was conducted on 22 Covid-19-recovered individuals. These individuals initially tested negative in an early sample collection and 19 (86%) remained negative in a subsequent sample collected at least 30 days later. This finding aligns with existing research⁶ suggesting that a portion of SARS-CoV-2 infected individuals may not develop antibodies, or their levels may fall below detectable limits.

Therefore, this study focuses on identifying risk factors associated with seropositivity for IgG-S antibodies following the primary SARS-CoV-2 infection in a population of individuals who recovered from Covid-19.

Methods

This prospective study employed a descriptive and analytical longitudinal design. It was conducted between August 2020 and June 2021 at two high-complexity public hospitals in Recife, Pernambuco, Brazil, and recruited individuals aged over 18 years who were treated at post-Covid-19 outpatients recovery clinics. Patients entered the outpatient clinic through three routes: referral from their attending physician following hospital discharge, self-referral, or invitation by the research team via telephone. The study was approved by the institutional ethics committee of the Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807).

During the first consultation, participants signed the informed consent form (ICF) and completed a questionnaire on sociodemographic characteristics, symptoms, comorbidities, and whether hospitalization had been required. Blood was then drawn. Individuals with no RT-PCR results, negative results for SARS-CoV-2, or prior Covid-19 vaccination were excluded.

All RT-PCR tests for detecting SARS-CoV-2 RNA, performed with nasopharyngeal swab samples, were analyzed at the Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE).

The study divided participants into two groups: Seropositive, which included participants with at least one positive sample; and Seronegative, which included participants with all negative samples. The persistence of IgG-S1 antibodies was assessed in three time periods after symptom onset: up to 90 days, 91-180 days, and after 180 days. Among the 238 enrolled participants, 87 provided two or more samples. To ensure a more accurate classification of seronegativity, participants with just one sample were excluded from the analysis. Hospitalized patients requiring oxygen therapy received glucocorticoids, such as dexamethasone 6mg daily or an equivalent dose.

To verify the serum presence of IgG-S1, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit from Euroimmun anti-SARS-CoV-2 (Lubeck, Germany) was used, one of the first diagnostic assays to be developed with the UE Declaration of Conformity and available worldwide. This methodology enables the quantitative detection of SARS-CoV-2-specific IgG against spike protein 1 (S1) using an enzyme immunoassay, and the results are presented in absorbance (optical density). This kit demonstrated a cumulative sensitivity of 82.6% for the detection of IgG-S1 in samples collected after 14 days of RT-PCR and a specificity of 86.9%⁷). Following the manufacturer's instructions, the semi-quantitative analysis of the results compared the absorbance value of the patient's sample to that of the calibrator. Results ≥ 1.1 were considered positive for the presence of IgG-S1.

Statistical analysis

For the statistical analysis we used SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows. Fisher's Exact Test was employed to determine statistically significant differences between groups for categorical variables. All tests were two-tailed with a level of 0.05. Missing data were excluded from the analysis. The odds ratios (OR) with the confidence intervals (CI) were calculated.

The following variables were included in the analysis: hospitalization, sex, age, no symptoms, high blood pressure, type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity (body mass index ≥ 30), smoking, sample collection time up to 90, 91-180 and after 180 days.

While researchers were not blinded when recruiting participants or assessing the results, the IgG-S1 detection tests themselves were blinded, since identifying the sample did not define the group allocation. Only the final data analysis revealed a global view of the results. Potential confounding factors were identified and addressed during data analysis.

Results

Two hundred and forty-five individuals were referred to the post-Covid-19 recovery clinic. Of these, 2 were excluded due to negative molecular test results and 5 for providing no test results. Thus, of the remaining 238, 87 participated in the analysis, providing two or more samples (Figure 1).

The study population was predominantly male (57.5%) and aged between 46 and 59 (50.6%). Nearly all participants (98.8%) reported symptoms, and 46% required hospitalization. Obesity (41%) and systemic arterial hypertension (45.9%) were the most common comorbidities. The majority (72.8%) of samples were collected within 90 days of symptom onset, and almost half (48.2%) had taken glucocorticoids (Table 1).

Table 1 – Clinical and biological characteristics of unvaccinated Covid-19-recovered individuals [Esta tem 3 columnas]

Variables		n	(continua) %
Sex			
Male	50	57.5	
Female	37	42.5	
Seroconversion*			
No	8	9.2	
Yes	79	90.8	
Age (years)			
18-45	20	23.0	
46 a 59	44	50.6	
60 or +	23	26.4	
Hospitalization			
Yes	40	46.0	
No	47	54.0	
Asymptomatic			
Yes	1	1.2	
Variables		n	%
No	86		
Obesity			
Yes	32	41.0	

[Esta tem 4 colunas?]
(conclusão)

Variables	n	%
No	46	59.0
SAH		
Yes	39	45.9
No	46	54.1
T2DM		
Sim	18	21.2
No	67	78.8
Smoking		
Never smoked	64	84.2
Current smoker	5	6.6
Former smoker	7	9.2
Taken glucocorticoids		
Yes	40	48.2
No	43	51.8
Time period when samples collected (in days)		
Up to 90 DAS	68	78.2
91 to 180 DAS	10	11.5
> 180 DAS	9	10.3

SAH: Systemic Arterial Hypertension; T2DM: type 2 diabetes mellitus; DAS: days after symptom onset.

Seroconversion*: individuals with all negative samples were considered seronegative, and those with at least one positive sample were considered seropositive.

Seronegative rates were observed in 9.2% of the sample. When comparing the seronegative group with the seropositive group, there were no significant differences in sex, age, or comorbidities. However, hospitalization rates differed – all seronegative participants were non-hospitalized (Table 2). Interestingly, 8.7% of seropositive individuals had an initial negative sample, later turning positive on the second or third test. The multivariate analysis was inconclusive.

Table 2 – Clinical and demographic characteristics of serological responders and non-responders after the primary SARS-CoV-2 infection

	Presence of IgG-S1		OR	CI 95 OR	p-value *
	Seronegative n (%)	Seropositive n (%)			
Sex					
Male	5 (10.0)	45 (90.0)	1.00	---	1.000
Female	3 (8.1)	34 (91.9)	0.26	0.06 – 1.25	
Age (years)					
18-45	4 (20.0)	16 (80.0)	1.00	---	Conclusão 0.209
46 a 59	3 (6.8)	41 (93.2)	0.29	0.06 – 1.46	
60 or +	1 (4.3)	22 (95.7)	0.18	0.02 – 1.17	
Hospitalization					
Yes	0 (0.0)	40 (100.0)	1.00	---	0.007
No	8 (17.0)	39 (83.0)	**	**	
Asymptomatic					
Yes	0 (0,0)	1 (100,0)	**	**	1,000
No	8 (9,4)	77 (90,6)	1,00	---	
Obesity					
Yes	2 (6,3)	30 (93,7)	1,00	---	0,460
No	6 (13,0)	40 (87,0)	2,25	0,42 – 11,94	
SAH					
Yes	3 (7,7)	36 (92,3)	0,68	0,15 – 3,06	0,721
No	5 (10,9)	41 (89,1)	1,00	---	
T2DM					
Yes	0 (0,0)	18 (100,0)	**	**	0,194
No	8 (11,9)	59 (88,1)	1,00	---	
Smoking					
Never smoked	7 (10,9)	57 (89,1)	**	**	0,765
Current smoker	0 (0,0)	5 (100,0)	1,00	---	
Former smoker	1 (14,3)	6 (85,7)	**	**	
Taken glucocorticoids					
Yes	1 (2,5)	39 (97,5)	0,13	0,02 – 1,13	0,059
No	7 (16,3)	36 (83,7)	1,00	---	
Time period , samples were collected (in days)					
Up to 90 DAS	5 (7,4)	63 (92,6)	1,00	---	0,166
91 to 180 DAS	1 (10,0)	9 (90,0)	1,40	0,15 – 13,39	
> 180 DAS	2 (22,2)	7 (77,8)	3,60	0,59 – 22,16	

(*) Fisher exact test (**) Not calculable; OR: odds-ratio IC: confidence interval

SAH: Systemic arterial hypertension; T2DM: type 2 diabetes mellitus; DAS: days after symptom onset.

Discussion

In this cohort, the study found a 9.2% seronegativity rate. Notably, participants with mild symptoms, who did not require hospitalization, were associated with an outcome of seronegativity. This aligns with findings from other studies.^{7,8}

Some studies have reported a higher proportion of seronegative patients, which have reached 71%⁶. Several factors may contribute to these discrepancies. These include variations in the assay specificity and sensitivity, as well as differences in the design and performance of the semiquantitative assays used, including the target antigen and analytical sensitivity ranges, in addition to variations in the populations studied.

In our investigation, seronegativity was defined as the inability to generate antibodies in all samples provided by each individual. The importance of this rigorous approach was evident when we observed that 8.7% of individuals presented at least one negative sample, but were able to seroconvert at another time. Furthermore, the analysis of multiple samples contributed to mitigating possible errors related to the serological kit.

No association was discovered between obesity and seroconversion. However, obesity has been described as a risk factor for seronegativity, since it promotes persistent inflammation and dysregulation of the immune system⁸. On the other hand, obesity is a risk factor for hospitalization due to Covid-19, which was strongly associated with seropositivity in our study.^{9,10}

Despite established knowledge regarding the decline in immune response to novel antigens in older adults, and the documented association between age and antibody response in SARS-CoV-2 infection, our analysis did not reveal a significant difference in the frequency of seronegative cases across different age groups.¹¹

Although evidence has shown that dexamethasone is beneficial in severe Covid-19 when administered after 7 days of symptom onset,¹² in this study, the frequent use of other glucocorticoids did not affect seroconversion in participants. This suggests that while glucocorticoids reduce B and T cell activity, they may not delay the antibody response in patients hospitalized with Covid-19.¹³

The main limitation of this study was the low number of participants who provided at least two samples. This restricted the robustness of the multivariate analysis. However, the study did reveal two important findings. First, it confirmed that some individuals do not develop antibodies following SARS-CoV-2 infection. Second, a strong trend suggested that mild covid-19 cases were the primary risk factor for this lack of seroconversion. Further research is crucial the cellular immune response in these individuals and their response to vaccination.

Abbreviations

SARS-CoV-2:

Severe acute respiratory syndrome-coronavirus

Covid-19:

Coronavirus disease 2019

SARS:

Severe acute respiratory syndrome

IgG-S:

Anti-spike Immunoglobulin G

RT-PCR:

Real-time polymerase chain reaction

LACEN-PE

Central Laboratory of Pernambuco

SAH

Systemic arterial hypertension

T2DM:

Type 2 diabetes mellitus

Ethics declarations

1.3.2 Ethics approval and consent to participate

This project was submitted to and approved by the Human Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco (CEP-HC-UFPE 46681521.7.0000.8807) in compliance with the guidelines and regulatory standards for research involving human beings. Individuals who agreed to participate in the study signed an informed consent form.

1.3.3 Consent for publication

Not applicable.

1.3.4 Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interesting

Availability of data and materials

Data are available upon request from the corresponding author.

Funding

This study was funded by the Financial Aid to Researchers project from the Central Administration of Postgraduate Studies at the Universidade Federal de Pernambuco (Number 078608/2020-11)

Author information

Department of Tropical Medicine, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Marta Iglis de Oliveira, Melayne Rocha Aciole, Patrícia Areias Neves Feitosa, Virginia Maria Barros de Lorena and Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil (Fiocruz-PE)

Virginia Maria Barros de Lorena

Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil (Fiocruz-PE)

Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Department of Infectious Diseases, Hospital das Clínicas, Brazilian Company of Hospital Services (EBSERH), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Marta Iglis de Oliveira and Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Recife Medical School, Medical Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Vitor Palmares Oliveira e Silva e Marcelo Palmares Oliveira e Silva

Authors' Contributions

MIO conceived the project, wrote the article, and provided outpatient care to individuals who had recovered from Covid-19 and who participated in the study. VPOS and MPOS interviewed and completed a questionnaire. PANF received, identified, processed and stored peripheral blood samples from volunteers in the project collection library. MRA and VMBL processed and performed the enzyme immunoassays. MIO performed the statistical analysis. VMBL and PSRA reviewed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank all the volunteers who agreed to participate in this study and the Central Administration of Postgraduate Studies at the Universidade Federal de Pernambuco.

References

- 1 Long, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with Covid-19. **Nature Medicine**, n. 26, p. 845-848, 2020.
- 2 Gallais, F. et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine** n. 71, p. 103-561, 2021.
- 3 Lumley, S. F. et al. Oxford University Hospitals Staff Testing Group. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2: infection in Health Care Workers. **New England Journal of Medicine**, n. 384, p. 533-540, 2021.
- 4 Gudbjartsson, D. F. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1724-1734, 2020.
- 5 L'Huillier, A. G. et al. Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection among hospital workers: a prospective longitudinal study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 5, p. 784.e1-784.e8, 2021.
- 6 Krishna, B. A. et al. Evidence of previous SARS-CoV-2 infection in seronegative patients with long Covid. **EbioMedicine**, n. 81, p. 104-129, 2022.
- 7 Gededzha, M. P. et al. Performance of the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. **PLoS One**, v., 16, n. 6, 2021.
- 8 Johannesen, C. K., et al. Risk factors for being seronegative following SARS-CoV-2 infection in a large cohort of health care workers in Denmark. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2021..
- 9 Ho, J. S. Y. CH in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. **Annals of the Academy of Medicine**, Singapore, v. 49, n. 12, p. 996-1008, 2020.

- 10 Paravidino, V. B. et al. Association between obesity and Covid-19 mortality and length of stay in intensive care unit patients in Brazil: a retrospective cohort study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 13737, 2022.
- 11 Yang, H. S. et al. Association of age with SARS-CoV-2 antibody response. *JAMA* , Open, Mar. 1, v. 4, n. 3, e214302, 2021.
- 12 Horby, P. et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693-704, 2021.
- 13 Mühlemann, B. et al. Impact of dexamethasone on SARS-CoV-2 concentration kinetics and antibody response in hospitalized Covid-19 patients: results from a prospective observational study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 10, 1520.e7-1520.e10, 2021.