

**COVID-19: AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL EM  
PROFISSIONAIS DE SAÚDE E EM UTENTES DE LARES**

Catarina Raquel Teixeira da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia

Orientado por:

Prof. Doutora Carina de Fátima Rodrigues  
Prof. Doutora Maria Cristina Martins Teixeira

Bragança, 2022/2023

## DECLARAÇÕES

É autorizada a reprodução integral desta dissertação/tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Ao abrigo do artigo 8º do decreto-lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados ou em publicação:

### *Apresentação em Poster no congresso:*

*“Avaliação da Imunidade Humoral em Profissionais de Saúde e utentes em lares de Idosos em Bragança antes da administração das duas primeiras doses de reforço da vacina COVID-19”*

*Congresso APTAC 2023*

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa jornada de pesquisa e aprendizagens, repleta de desafios ao longo do caminho. Embora este processo possa ser solitário, é importante reconhecer que o sucesso de um trabalho de mestrado depende dos valiosos contributos de várias pessoas.

Aproveito esta secção para realçar o meu mais sincero agradecimento a todos que se cruzaram e me acompanharam durante todo este percurso.

À minha orientadora, Professora Doutora Carina de Fátima Rodrigues por ter aceitado integrar-me na sua equipa, pela disponibilidade demonstrada, pelos esclarecimentos cruciais para o desenvolvimento do trabalho, pelo seu elevado e rigoroso nível científico, pelo seu interesse permanente e pela sua visão crítica e oportuna.

Agradeço, de igual forma, à Professora Doutora Maria Cristina Martins Teixeira, por ter aceitado ser minha coorientadora, pela sua disponibilidade e conhecimentos transmitidos, pelo seu contributo e ajuda no tratamento de dados estatísticos.

Aos meus pais, Manuel Silva e Elisabete Teixeira por me darem as ferramentas necessárias e confiança para alcançar com sucesso os meus objetivos.

À minha irmã e ao meu afilhado, um especial agradecimento pelo incentivo e carinho recebido ao longo deste percurso.

À minha avó, Arminda Magalhães que, mesmo não estando entre nós, sempre foi o meu refúgio e a minha fonte de motivação ao longo de todo o meu percurso académico.

À minha companheira de todas as horas, Beatriz Silva, agradeço o apoio incondicional ao longo deste processo e acima de tudo por acreditar sempre em mim.

Por fim, não posso esquecer o apoio dos restantes familiares e amigos, que desempenharam um papel crucial ao oferecer suporte emocional, encorajamento e compreensão durante todo o processo. Eles foram um porto seguro e um ombro de apoio nos momentos de frustração e exaustão, tornando esta jornada significativa e menos difícil.

## RESUMO

A vacinação é uma estratégia eficaz de prevenção. Vários estudos comprovam que ela reduz a ocorrência de infecções por COVID-19, bem como a gravidade dos sintomas e a mortalidade associada à doença. Tanto a infecção natural pelo vírus SARS-CoV-2, quanto a imunização por meio da vacinação desencadeiam uma resposta imunológica que resulta na produção de anticorpos direcionados contra a proteína viral Spike (IgG anti-S). Em pessoas vacinadas, com vacinas de tecnologia de RNA mensageiro, é possível identificar aquelas que foram recentemente infetadas por meio da detecção de anticorpos contra a proteína Nucleocapsídeo (IgG anti-N) e essa reatividade observada será exclusivamente devido à infecção e não à vacinação, uma vez que a proteína Nucleocapsídeo não é o alvo na formulação dessas vacinas.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a imunidade humoral em profissionais de saúde, da Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança e em utentes de lares da terceira idade, também do distrito de Bragança. Esta avaliação foi realizada em momentos distintos, o primeiro antes da administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19 (T1) e, a segunda, antes da 2ª dose de reforço (T2), através de uma quantificação de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, no soro dos participantes. O estudo envolveu 231 profissionais de saúde, 148 (79,2%) mulheres e 74 (20,8%) homens, com uma média de idades de  $48,9 \pm 10,1$  anos e 222 utentes de lares de idosos, 148 (66,6%) mulheres e 74 (33,3%) homens, com uma média de idades de  $87,2 \pm 8,1$  anos. Todos os participantes foram vacinados com os esquemas de vacinação definido pelo Serviço Nacional de Saúde.

Os testes serológicos foram realizados em amostras de soro através de um Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes. Para tal, foram utilizados os ensaios da Abbott, SARS-CoV-2 IgG II, que quantifica os anticorpos contra a proteína da espícula (Spike; anti-S/RBD) e Quant e SARS-CoV-2 IgG Quant I que nos dá a reatividade para os anticorpos anti-nucleocapsídeo (anti-N), no equipamento ARCHITECT i1000SR (Abbott).

Na análise qualitativa, definindo pontos de corte estabelecidos pelo fabricante, foram identificadas diferenças significativas na reatividade para anti-N e anti-S, de acordo com a data da colheita (T1 ou T2). Em ambos os grupos verificou-se um aumento considerável na reatividade contra os anticorpos anti-N em T2, o que sugere um aumento na

percentagem de indivíduos com infeção recente na segunda colheita uma vez que estes anticorpos resultam da resposta à infeção e não como resultado da inoculação. Para os anticorpos anti-S, a reatividade em T1 foi de 95.5% para os idosos e 99.5% e em T2 foi de 100% para ambos os grupos. A análise quantitativa dos anticorpos anti-S revelou diferenças significativas entre os níveis de anticorpos apresentados em unidades de ligação a anticorpo (BAU) nos dois períodos em estudo. Para o total de participantes do grupo de utentes de lares e profissionais de saúde e os valores foram muito superiores em T2 vs T1, foram respetivamente [mediana; Interquartil;IQR], 4015.7 [1709.9; 5680.0] vs. 278.2 [72.4; 1086.5] para os utentes de lares, como no grupo de profissionais de saúde 455.3 [160.4; 1608.7] vs. 104.6 [50.9; 342.1]. A mesma diferença foi observada quando a amostra foi estratificada pelo sexo e pelas categorias “com infeção” e “sem infeção”.

Na análise dos grupos em estudo, observamos uma seroprevalência substancialmente mais elevada dos anticorpos anti-S e anti-N no período que precede a segunda dose de reforço em comparação com a primeira. Os participantes apresentaram níveis de anticorpos anti-S significativamente superiores na segunda colheita, sugerindo uma resposta robusta à administração da dose adicional e ao aumento do número de infeções.

Embora estes resultados sejam promissores para compreender a cinética de variação de anticorpos na COVID-19, a eficácia protetora precisa ser corroborada por estudos adicionais, incluindo investigações sobre a capacidade de neutralização e a imunidade celular.

**Palavras-Chave: COVID-19; SARS-CoV-2; vacinação, imunidade humoral, anticorpos IgG, anti-Nucleocapside; anti- Spike.**

## ABSTRACT

Vaccination is an effective preventive strategy. Several studies confirm its ability to reduce the incidence of COVID-19 infections, as well as the severity of symptoms and mortality associated with the disease. Both natural infection with the SARS-CoV-2 virus and immunization through vaccination trigger an immune response that results in the production of antibodies directed against the viral Spike protein (anti-S IgG). In individuals vaccinated with mRNA technology vaccines, it is possible to identify those who were recently infected by detecting antibodies against the Nucleocapsid protein (anti-N IgG), and this reactivity observed will be exclusively due to the infection and not the vaccination, as the Nucleocapsid protein is not the target in the formulation of these vaccines.

The main objective of this study was to assess humoral immunity in healthcare professionals from the Northeast Bragança Local Health Unit and in elderly care home residents in the Bragança district. This assessment was conducted at different times, the first before the administration of the first COVID-19 booster dose (T1), and the second before the 2nd booster dose (T2), by quantifying specific anti-SARS-CoV-2 antibodies in the participants' serum. The study involved 231 healthcare professionals, 148 (79.2%) women and 74 (20.8%) men, with an average age of  $48,9 \pm 10,1$  years, and 222 elderly care home residents, 148 (66.6%) women and 74 (33.3%) men, with an average age of  $87,2 \pm 8,1$  years. All participants were vaccinated according to the vaccination schedules defined by the National Health Service.

The serological tests were conducted on serum samples using a Chemiluminescent Microparticle Immunoassay. Specifically, the Abbott assays, SARS-CoV-2 IgG II, which quantifies antibodies against the spike protein (Spike; anti-S/RBD), and Quant and SARS-CoV-2 IgG Quant I, which assess reactivity for anti-nucleocapsid antibodies (anti-N), were employed on the ARCHITECT i1000SR equipment (Abbott).

In the qualitative analysis, defining cutoff points established by the manufacturer, significant differences in reactivity for anti-N and anti-S were identified based on the sample collection date (T1 or T2). In both groups, a substantial increase in reactivity against anti-N antibodies at T2 was observed, suggesting an elevation in the percentage of individuals with recent infection in the second collection, as these antibodies result from the response to infection rather than vaccination. For anti-S antibodies, reactivity at

T1 was 95.5% for the elderly and 99.5% for both groups, increasing to 100% at T2 for both groups.

Quantitative analysis of anti-S antibodies showed significant differences in the levels of antibodies presented in antibody binding units (BAU) during the two periods under study. For the total participants in the nursing home residents and healthcare professionals group, the values were much higher in T2 vs T1, respectively [median; Interquartile Range; IQR], 4015.7 [1709.9; 5680.0] vs. 278.2 [72.4; 1086.5] for nursing home residents, and in the healthcare professionals group, 455.3 [160.4; 1608.7] vs. 104.6 [50.9; 342.1]. The same difference was observed when the sample was stratified by gender and by the categories "with infection" and "without infection."

In the analysis of the study groups, we observed a substantially higher seroprevalence of anti-S and anti-N antibodies in the period preceding the second booster dose compared to the first. Participants exhibited significantly higher levels of anti-S antibodies in the second collection, suggesting a robust response to the administration of the additional dose and an increase in the number of infections.

While these results are promising for understanding the kinetics of antibody variation in COVID-19, protective efficacy needs further validation through additional studies, including investigations into neutralization capacity and cellular immunity.

**Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; vaccines; Humoral immunity; IgG antibodies; Nucleocapsid; Spike.**

# Índice

<b>DECLARAÇÕES.....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>XIV</b>
<b>CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
1.1.    ENQUADRAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	17
1.2.    O NOVO CORONAVÍRUS - SARS-CoV-2 .....	19
1.3.    FISIOPATOLOGIA DA COVID-19.....	20
1.4.    VACINAS COVID-19.....	25
1.5.    VARIANTES DE SARS-CoV-2 .....	27
1.6.    MÉTODOS PARA ESTUDO DA IMUNIDADE HUMORAL.....	29
1.6.1. <i>Métodos de Análise qualitativa e quantitativa de anticorpos .....</i>	<i>30</i>
1.6.2. <i>Testes de Neutralização.....</i>	<i>36</i>
1.7.    IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE NA COVID-19.....	39
<b>CAPÍTULO II – OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1.    POPULAÇÃO ALVO E DESENHO DO ESTUDO.....	44
3.2.    SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	44
3.3.    PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS .....	45
3.3.1. <i>Colheita de sangue.....</i>	<i>46</i>
3.3.2. <i>Preparação e Armazenamento das Amostras.....</i>	<i>46</i>
3.3.3. <i>Análise Serológica .....</i>	<i>46</i>
3.4.    INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....	47
3.5.    ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
3.6.    CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	48
<b>CAPÍTULO IV – RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>

RESULTADOS.....	51
4.1. CARATERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
4.2. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA REATIVIDADE ANTI-NUCLEOCAPSÍDEO E ANTI- SPIKE DO VÍRUS SARS-COV-2... ..	51
4.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ANTICORPOS .....	53
<b>CAPÍTULO V – DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
DISCUSSÃO.....	57
<b>CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
ANEXO I- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA .....	80
ANEXO II- FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Evolução de novos casos entre 2020 a 2022 em Portugal .....	18
Figura 2- Apresentação esquemática da Organização do Genoma e estrutura viral do SARS-CoV-2.....	20
Figura 3- Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2 .....	22
Figura 4- Processo de Infecção SARS-CoV-2 .....	23
Figura 5- Sintomatologia e Complicações COVID-19.....	24
Figura 6-Principais métodos para diagnóstico para SARS-CoV-2 .....	30
Figura 7- Teste Rápido de Antígeno e Anticorpos.....	32
Figura 8- Métodos de ELISA e o método CLIA .....	34
Figura 9- Neutralização SARS-CoV-2 .....	38
Figura 10: Linha temporal dos principais acontecimentos relacionados com a vacinação, momento da colheita, grupos envolvidos, prevalência de estirpes.....	44
Figura 11- Desenho do Estudo. ....	45
Figura 12- Diferença para a concentração de IgGs Anti-S entre T1 e T2 em utentes de lares de idosos de Bragança.....	54
Figura 13- Diferença para a concentração de IgGs Anti-S entre T1 e T2 em profissionais de saúde .....	55

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização da amostra.....	51
Tabela 2- Análise qualitativa dos anticorpos IgGs anti-N nos dois grupos e em diferentes tempos.....	52
Tabela 3- Análise qualitativa dos anticorpos IgG-anti S nos dois grupos e em diferentes tempos.....	52
Tabela 4- Determinação quantitativa de IgG anti- S nos dois grupos nas duas colheitas .....	53

## ABREVIATURAS

<b>ACE2</b>	Enzima conversora da angiotensina 2
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Ag</b>	Antigénio
<b>AU</b>	Unidades Arbitrárias
<b>BAU</b>	Unidade de Anticorpos de Ligação
<b>CIMO</b>	Centro de Investigação de Montanha
<b>CLIA</b>	<i>Chemiluminescence Immunoassay</i> (Imunoensaio quimioluminescente)
<b>CMIA</b>	Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes
<b>COI</b>	Cutoff index, (Ponto de corte)
<b>COVID-19</b>	<i>CoronaVirus Disease 2019</i> , (Doença do Coronavírus 2019)
<b>CRISPR</b>	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas
<b>DGS</b>	Direção Geral de Saúde
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<b>E</b>	Proteína de envelope do vírus SARS-COV-2
<b>ECBS</b>	Comité de Especialistas em Padronização Biológica da OMS
<b>ECLIA</b>	Eletroquimioluminescência
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
<b>EMA</b>	Agência Europeia do Medicamento
<b>EPI</b>	Equipamentos de Proteção Individual
<b>ERGIC</b>	ER-Complexo de Golgi
<b>EU</b>	União Europeia
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HCoV</b>	<i>Human coronavirus</i> (Coronavírus com capacidade de infetar humanos)
<b>HPV</b>	Vasoconstrição Pulmonar Hipóxica
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>IFN</b>	Interferão
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IQR</b>	Amplitude Inter-quartil
<b>INSA</b>	Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge

<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>LAMP</b>	<i>Mediated Isothermal Amplification</i> (amplificação isotérmica)
<b>LFIA</b>	Imunoensaio de Fluxo Lateral
<b>M</b>	Proteína Transmembranar do vírus SARS-COV-2
<b>MERS-CoV</b>	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> , (Síndrome Respiratória do Oriente Médio)
<b>mL</b>	Militro
<b>MLG</b>	Modelo Linear Generalizado
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
<b>N</b>	Proteína Nucleocapsídeo do vírus SARS-COV-2
<b>NAbs</b>	Anticorpos de Neutralização
<b>NIBSC</b>	Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de leitura aberta)
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , (Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)
<b>RBD</b>	<i>Receptor-binding domain</i> , (Domínio de ligação ao recetor)
<b>RLU</b>	Unidade de luz relativa
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> , (Ácido Ribonucleico)
<b>S</b>	Proteína <i>Spike</i> do vírus SARS-COV-2
<b>SARS-CoV</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> , (Síndrome Respiratória Aguda Grave)
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> , (Síndrome Respiratória Aguda Grave-2)
<b>SISLAB</b>	Sistema Integrado de Gestão Laboratorial
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>TAANs</b>	Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>TRAg</b>	Teste de antigénio
<b>TMPRSS2</b>	<i>Transmembrane protease, serine 2</i> , (Protéase Transmembranar de Serina 2)
<b>UE</b>	União Europeia

<b>ULSNE</b>	Unidade Local de Saúde do Nordeste
<b>VOCs</b>	<i>Variant of Concern</i> (Variantes de Preocupação)
<b>VOIs</b>	<i>Variant of Interest</i> (Variantes de Interesse)

## INTRODUÇÃO

Desde março de 2020, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que o mundo vivia uma pandemia de Coronavírus 2019 (do inglês: *CoronaVirus Disease 2019*; COVID-19), acompanha-se um quadro sanitário sem precedentes nos últimos cem anos (OMS, 2020).

Em resposta a esta pandemia, provocada pelo novo coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (do inglês: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*; SARS-CoV-2), houve um esforço conjunto de vários países para desenvolver vacinas contra a doença COVID-19 (Bonanni et al., 2021).

Várias vacinas foram rapidamente desenvolvidas e aprovadas para a prevenção da COVID-19. Mais de 11 mil milhões de doses de vacinas foram administradas de acordo com a OMS (Hussain et al., 2021). Efetivamente, é necessário saber se as vacinas são eficazes e se proporcionam respostas imunitárias duradouras e se não causam efeitos secundários. Muitos trabalhos têm sido realizados na determinação da resposta humoral e celular à vacina e à infeção por SARS-CoV-2 (Hoffmann et al., 2020a).

Apesar do grande esforço dos grupos de trabalho da OMS na definição de padrões, para permitir comparar resultados dos estudos serológicos, inferir sobre a proteção de cada indivíduo à infeção, com base na quantificação de anticorpos, continua a ser difícil (Boan et al., 2022; Kristiansen et al., 2021; Zhu et al., 2022). Com a vaga da variante ómicron, muitas pessoas vacinadas foram infetadas. Diferentes grupos de investigação tentam perceber se existe perda da capacidade de neutralização do soro nos indivíduos vacinados em relação a esta nova variante (L. Liu et al., 2022). Dada a diferença na capacidade de infeção das variantes SARS-CoV-2 e uma vez que o vírus tem uma elevada capacidade de mutação, vai ser muito difícil estabelecer esta relação. Contudo, esta avaliação tem de continuar para se perceber o ponto a partir do qual não há necessidade das doses do reforço da vacina.

A inoculação contínua da vacina tem sido alvo de preocupação para os epidemiologistas. Existem evidências que pode levar à diminuição dos níveis de linfoblastos e, por sua vez, à diminuição dos níveis de anticorpos, originando “tolerância” à vacina e aumento das probabilidades de efeitos colaterais como miocardite e outras doenças inflamatórias (Samanovic et al., 2021).

Com este trabalho pretende-se contribuir para a avaliação do status imunitário de dois grupos diferentes no momento anterior à administração das doses de reforço.

O trabalho que se apresenta faz parte de um projeto maior (NORDTESTE COVID-19- “Infeção por SARS-CoV-2: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença” - 02/SAICT/2020/072562) nas atividades que incluíram a colaboração da Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE). Uma das atividades deste projeto está relacionada com a avaliação da imunidade humoral na COVID-19 em profissionais de saúde e utentes de lares de idosos, do distrito de Bragança.

Esta dissertação é apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e ao Instituto Politécnico da Guarda (IPG), no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio/Dissertação, que corresponde ao segundo ano do mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia. O documento está dividido em vários capítulos, apresentando o estado da arte sobre imunidade humoral na COVID-19 e as principais metodologias e resultados da sua avaliação.

## **CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO**

---

## 1.1. Enquadramento epidemiológico

Em dezembro de 2019, a China reportou à OMS um cluster de pneumonia de etiologia desconhecidas em trabalhadores e frequentadores do mercado de peixe, mariscos vivos e aves, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. A 7 de janeiro de 2020, as autoridades chinesas identificaram um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, com origem zoonótica, como o agente causador de COVID-19. A 11 de março de 2020, foi declarada pela OMS como pandemia internacional (OPAS/OMS Brasil, 2020).

Segundo um documento publicado pela OMS, a 3 de janeiro de 2020 existiam 44 pacientes infetados com pneumonia de etiologia desconhecida sendo que 11 pacientes se encontravam com um quadro clínico grave. Assim sendo, a 8 de Janeiro de 2020, o sequenciador genético demonstrou um novo Coronavírus como o potencial organismo causal. A 11 de março de 2020, a OMS declarou o SARS-CoV-2 como uma pandemia com casos confirmados em 114 países, já em meados de março, a Europa tinha mais casos do que em qualquer outra parte do mundo, com um total de 160 países infetados com a COVID-19 (Ochani et al., 2021).

A situação pandémica evoluiu exponencialmente em todo o mundo, particularmente na União Europeia (UE) (World Health Organization, 2020a). Um dos primeiros relatórios publicados pela OMS em clima pandémico, datado de 30 de março de 2020, contabilizava a nível mundial, 750 890 casos confirmados, 36 405 óbitos por COVID-19; a nível Europeu, Portugal ocupava nessa altura o 11º lugar (World Health Organization, 2020b).

Em Portugal, os primeiros casos registados de COVID-19 foram a 2 de março de 2020 (Direção Geral de Saúde, 2020) e a 18 março de 2020 foi decretado o Estado de Emergência em Portugal, através do Decreto do Presidente da República n.º 14-A/2020, de 18 de março (Presidência da República, 2020). A situação pandémica demonstrou ser imprevisível tanto a nível mundial, como em Portugal, devido à alta taxa de transmissibilidade do vírus SARS-CoV-2, o surgimento de novas variantes, o aumento do número de casos confirmados de COVID-19, internamentos e óbitos, a inexistência de um tratamento específico, tudo isto fez com que o país se tivesse de adaptar às várias realidades face à evolução da situação pandémica. O Estado de Emergência manteve-se desde o dia 18 de março até ao dia 2 de maio de 2020.

A 3 de maio de 2020, é iniciado o plano de transição para uma situação de calamidade, devido à melhoria do contexto pandémico, sendo aplicadas medidas de desconfinamento. Todavia, o Estado de Emergência volta a ser implementado a dia 6 de novembro de 2020, devido ao agravamento da situação epidemiológica. Em finais de dezembro do mesmo ano, começaram a ser administradas vacinas no país (Presidência de República, 2020a), e em outubro de 2021 é adicionada uma dose de reforço da vacina COVID-19 ao programa de vacinação (Serviço Nacional de Saúde, 2021).

Assim, estima-se que, em Portugal, até março de 2023, houve um total de casos confirmados de 3.413.013 e um número de 21.342 óbitos (DGS, 2023). Na figura 1, apresenta-se um gráfico da evolução de novos casos, entre 2020 a 2022, em Portugal.

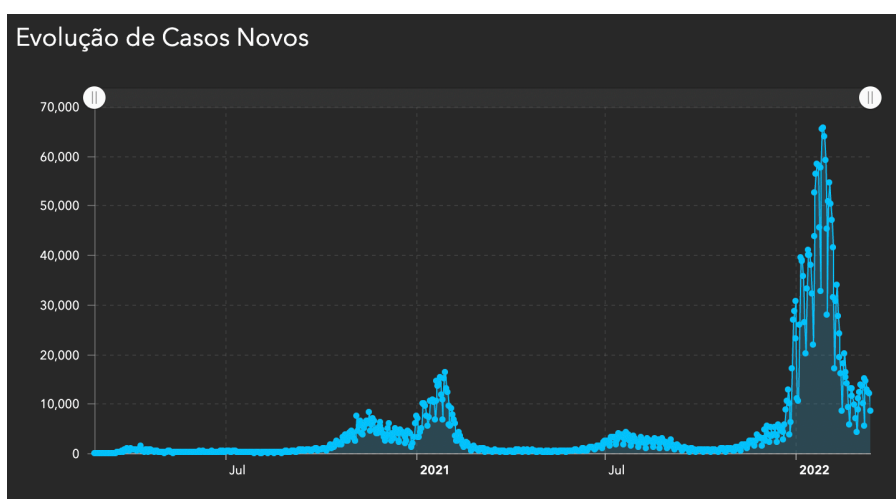


Figura 1- Evolução de novos casos entre 2020 a 2022 em Portugal (DGS, 2023)

Com a implementação do plano de vacinação em curso, a descida do número de mortes, internamentos, bem como a redução da transmissibilidade e a estabilização do número de novos casos leva a uma não-renovação do Estado de Emergência e é implementada a situação de Calamidade, que ocorreu a 1 de maio de 2021. É de salientar que, no decorrer do ano 2020 e 2021, foram ativadas várias vezes a situação de contingência e o estado de alerta (Presidência de República, 2020b).

Todas as limitações impostas ao longo da pandemia, foram postas em prática com o propósito de conter a transmissão do vírus e consequentemente reduzir a expansão da doença, destacando-se os confinamentos e fecho de fronteiras, bem como a adoção de medidas preventivas, o distanciamento social, o uso obrigatório de máscara e

higienização das mãos. Além disso, a capacidade de fornecer testes serológicos e diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos, mostrou ser fundamental na gestão e prevenção da disseminação do vírus SARS-CoV-2 (Vardoulakis et al., 2020).

## **1.2. O Novo Coronavírus - SARS-CoV-2**

O SARS-CoV-2 é um novo vírus, que pertence à ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae*, da subfamília taxonómica *Orthocoronavirinae* e do género *Betacoronavirus*, sendo que apresenta semelhanças com o SARS-CoV, na estrutura do genoma, tropismo dos tecidos e patogénese viral. No entanto, o SARS-CoV-2 apresenta-se mais transmissível e a sua diversidade das respostas imunitárias é mal compreendida.

Os coronavírus são altamente patogénicos e apresentam um antagonismo do interferão potente (IFN), que é evidente em casos de COVID-19 grave, com sinalização reduzida do IFN, e uma resposta imunitária demasiado agressiva composta por citoquinas/chemoquinas elevadas (Harrison et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é uma das sete estirpes de coronavírus conhecidas com capacidade de infetar humanos (HCoV) (HASÖKSÜZ et al., 2020a). Este pertence ao mesmo subgénero que os outros dois coronavírus, que são responsáveis por desencadear anteriormente surtos epidémicos em grande escala em humanos, vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV; novembro 2002), vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV; abril 2012) (HASÖKSÜZ et al., 2020a). Todos os três coronavírus estão na lista do *Blueprint* da OMS, para agentes patogénicos prioritários para pesquisa devido ao seu potencial epidémico e à falta de tratamentos eficazes (World Health Organization, 2020c).

A sequência genómica do SARS-CoV-2 apresenta-se idêntica com a sequência de outros Coronavírus, nomeadamente, em mais de 80% com a do SARS-CoV e em cerca de 50% com a do MERS-CoV (Harrison et al., 2020).

Estruturalmente, é importante realçar o facto de o SARS-CoV-2, tal como os restantes coronavírus, possuir um genoma de aproximadamente 30 kilobases (kb), o que faz deste vírus uma exceção no contexto dos vírus com genoma RNA, os quais raramente ultrapassam 10-15 kb Este vírus compreende 29.891 nucleotídeos que codificam 9.860 aminoácidos (Muralidar et al., 2020).

Assim sendo, o SARS-CoV-2 (Figura 2) é um vírus de RNA de cadeia simples, sendo que a organização do seu genoma encontra-se dividido em várias “Open Reading Frames” (ORF), que vão dar origem a proteínas estruturais, classificadas como S (Spike), E (envolpe), M (membrana) e N (nucleocapsídeo), e proteínas não estruturais que surgem das ORF1a e ORF1b.

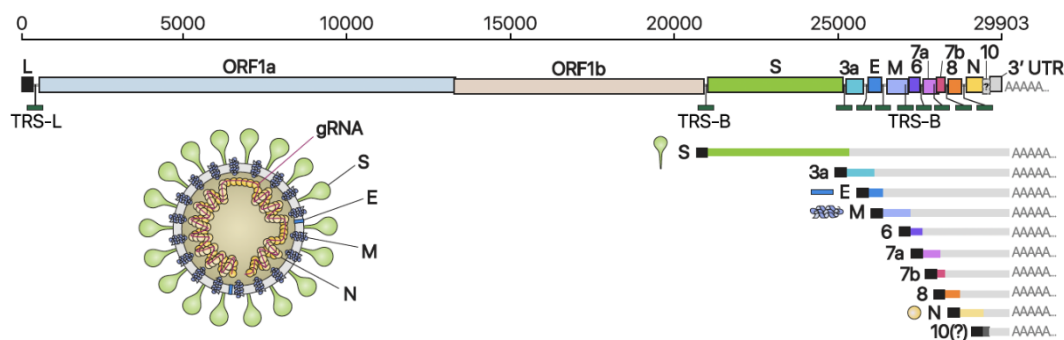


Figura 2- Apresentação esquemática da Organização do Genoma e estrutura viral do SARS-CoV-2.( Kim et al., 2020)

As proteínas estruturais são produzidas através da transcrição e tradução dos ácidos ribonucleicos (RNAs) mensageiros sub-genómicos, que surgiram por complementaridade com a cadeia de RNA original. Por sua vez, as proteínas não estruturais advêm do RNA genómico, que após a entrada na célula hospedeira é traduzido na poliproteína 1ab, que após ser clivada por proteases virais (nsp3 e nsp5) dá, então, origem a 16 proteínas não estruturais com diversas funções, sendo que todas estão envolvidas mais ou menos diretamente no processo de replicação viral (Kim et al., 2020).

### 1.3. Fisiopatologia da COVID-19

O vírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico da doença COVID-19, o qual tem causado uma mortalidade sem precedentes em todo o mundo.

#### 1.3.1. Transmissão e infecção

Das quatro proteínas acima referidas, a mais abundante é a glicoproteína S. Esta é responsável por mediar a entrada do vírus nas células hospedeiras, através do processo de fusão do invólucro viral com a membrana celular que, conseqüentemente, irá dar início ao ciclo replicativo do vírus (Azevedo-Pereira, 2020; Harrison et al., 2020).

Relativamente à sua estrutura, esta proteína possui um domínio de ligação ao recetor (RBD), que é o responsável por mediar o contacto direto com o recetor celular

enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e ainda duas subunidades (S1 e S2), que surgem de forma independente após a clivagem proteolítica pela catepsina celular L e pela protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), que estão também envolvidas no processo da entrada do vírus nas células (Harrison et al., 2020). Devido a esta estrutura e à função importante que desempenha no ciclo replicativo do vírus (Figura 3), a glicoproteína S torna-se um alvo particularmente importante quer de anticorpos, quer de moléculas inibidoras (Azevedo-Pereira, 2020).

Atendendo à necessidade de se ligar ao recetor celular ACE2 para conseguir entrar nas células do hospedeiro, o SARS-CoV2 apresenta tropismo celular para células que apresentam este recetor, ou seja, células da gama ACE2+(Azevedo-Pereira, 2020; Harrison et al., 2020).

Assim, as células suscetíveis de serem infetadas por este vírus são células endoteliais de artérias e veias, enterócitos, células renais, células epiteliais do trato respiratório e ainda células dendríticas, monócitos e macrófagos alveolares (Azevedo-Pereira, 2020). A nível de transmissão e infeção viral, este é feito de pessoa para pessoa, por meio de gotículas ou contato direto com superfícies contaminadas e, no que diz respeito ao período de incubação, o vírus SARS-CoV-2, de forma semelhante a outros vírus, que causam infeções respiratórias, apresenta um período de incubação curto (Azevedo-Pereira, 2020).

Quando a proteína S do SARS-CoV-2 se liga ao recetor ACE2 da célula-alvo, desencadeia uma série de eventos. Isso inclui a clivagem da proteína S por proteases da célula hospedeira, resultando na fusão do vírus com a membrana da célula. Além disso, o vírus pode entrar na célula por endocitose. Dentro da célula, a proteína N se separa do genoma de RNA de sentido positivo (+) do SARS-CoV-2 e é traduzido em poliproteínas pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são processadas em proteínas não estruturais (nsp1-16) que desempenham um papel importante na formação de complexos de replicação e transcrição viral. Elas também remodelam a membrana celular, formando organelos de replicação chamados DMVs, que estão conectadas ao retículo endoplasmático e são locais de replicação do RNA viral. O RNA viral recém-replicado sai das DMVs e é direcionado para locais de tradução ou montagem do virião. As proteínas estruturais traduzidas a partir do RNA viral são transportadas para a membrana do retículo endoplasmático e, em seguida, passam pelo compartimento intermediário ER-Complexo de Golgi (ERGIC).

Nesse ponto, ocorre a montagem do novo virião, que  liberado da célula hospedeira (Wu et al., 2023).

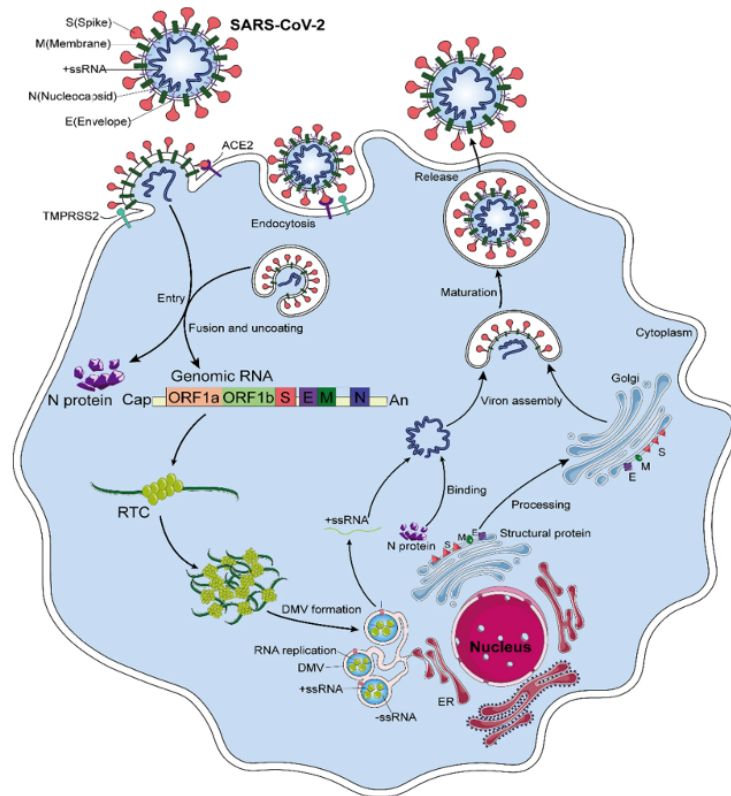


Figura 3- Representao esquemática do ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2; Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), protease transmembranar de serina 2 (TMPRSS2) (Wu et al., 2023)

Desta forma, quando o vírus SARS-CoV-2 entra pelas vias respiratórias, nariz e garganta, ele  recebido pelo epitelio do aparelho respiratório superior, onde se encontra presente, a ACE2, enzima que tem como funo auxiliar a regulao da pressão sanguínea, sendo expressa em diversos órgãos nomeadamente no trato respiratório, digestivo e renal (Ahlawat et al., 2020). Esta localizao explica o tropismo tecidual do SARS-CoV-2 para o pulmão, intestino delgado e rim (HASKSZ et al., 2020b).

A ACE2 desempenha um papel crucial na infeo, uma vez que o SARS-CoV-2 usa como recetor a enzima ACE2, para entrar nas células hospedeiras após ativao da proteína S, pela TMPRSS2 (Hoffmann et al., 2020a) (Figura 4). A infeo por SARS-CoV-2 ocorre então após a entrada do vírus na célula alvo, como consequência da união entre o RBD viral da proteína S e o recetor ACE2 (Machhi et al., 2020a). A proteína S vai acoplar ao ACE2 e sofrer uma divisão para que haja a fusão da membrana viral com

a célula e endocitose, permitindo a libertação do RNA, que está no interior do vírus na célula hospedeira (Hoffmann et al., 2020b).

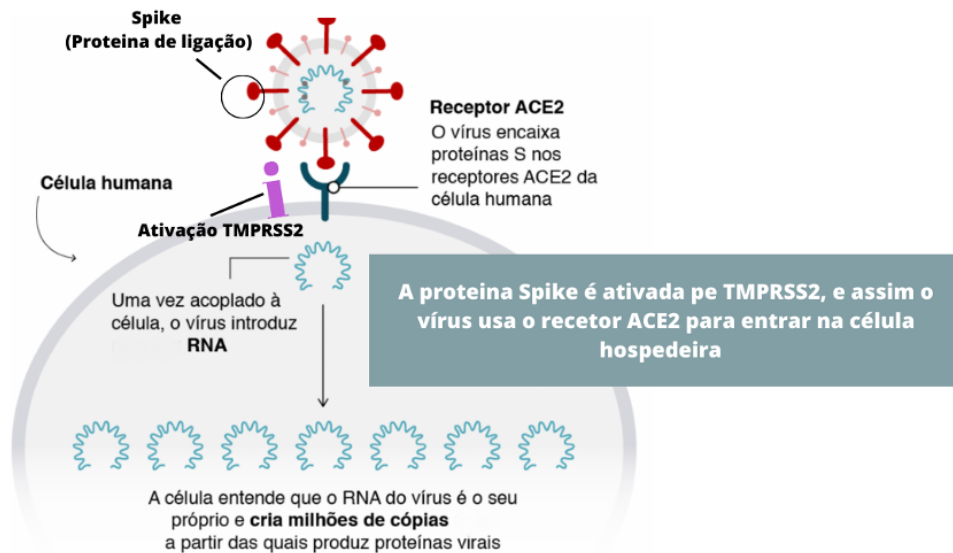


Figura 4- Processo de Infecção SARS-CoV-2; Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), protease transmembranar de serina 2 (TMPRSS2) adaptado de (Associação Portuguesa de Hospitalização Privada, 2020)

### 1.3.2 Sintomatologia

A COVID-19 é uma doença sistémica que pode afetar outros órgãos para além dos pulmões, por disseminação através da corrente sanguínea, tais como: rim, fígado, músculos, sistema digestivo, sistema nervoso e baço (Machhi et al., 2020b). As pessoas com COVID-19 têm apresentado uma ampla variedade de sintomas, entre sintomas leves a doença grave. Os sintomas mais comuns tendem a aparecer de 2 a 14 dias após a exposição ao vírus. Um dos principais problemas em relação à COVID-19 é que os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, podendo as manifestações clínicas serem diferentes entre pacientes, desde a ausência de sintomas, a sintomas leves ou moderados (febre, tosse, dor de garganta, cansaço, dores musculares, perda de paladar e/ou olfato, alterações gastrointestinais) e, em casos mais graves, evoluir para uma pneumonia grave, síndrome respiratória aguda grave, septicémia, choque séptico e eventual morte (Figura 5) (CDC, 2021; Machhi et al., 2020b).

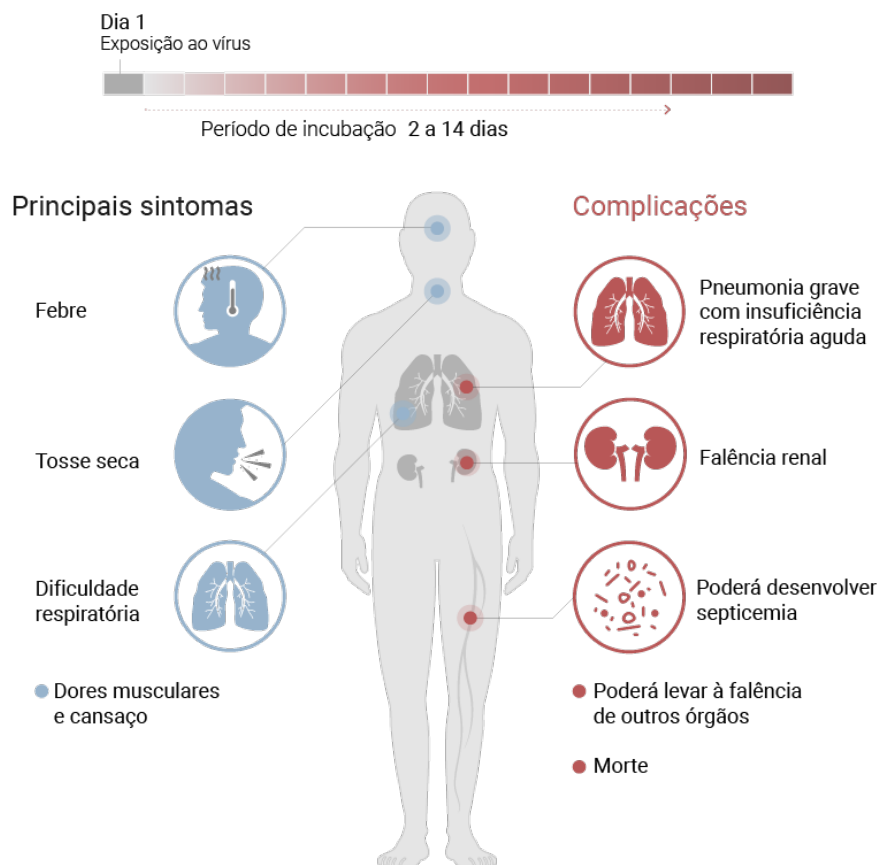


Figura 5- Sintomatologia e Complicações COVID-19 (RTP, 2020)

Entre as formas mais comuns de sequelas pulmonares devido à doença COVID-19 encontram-se o dano alveolar difuso e a pneumonia. Este consiste na presença de membranas hialinas (exsudados intra-alveolares), assim como na hiperplasia de pneumócitos tipo II, podendo culminar em fibrose pulmonar (Salehi et al., 2020).

Adicionalmente, a doença COVID-19 afeta ainda a circulação pulmonar, uma vez que a vasoconstrição pulmonar hipóxica (HPV) ocorre numa tentativa de resposta à hipoxia alveolar presente, devido ao edema pulmonar e à pneumonia, que muitas vezes se verifica em doentes graves com COVID-19. No entanto, quando esta HPV fica comprometida, os “shunts” intrapulmonares causam o decréscimo dos níveis de oxigénio presente no fluxo sanguíneo dos vasos pulmonares contribuindo para um défice de fornecimento de oxigénio, assim como para a falha múltipla de órgãos (Shaw et al., 2021).

Por outro lado, entre as várias consequências da doença COVID-19 severa, o colapso cardiovascular parece ser a mais grave e potencialmente letal. Este consiste na perda significativa de funções cardíacas em geral, que se pode traduzir em arritmias, enfarte agudo do miocárdio e paragem cardíaca.

Uma das causas deste colapso cardiovascular, que mais se verificou em doentes com COVID-19, foi a lesão miocárdica. Esta manifesta-se através da elevação dos níveis séricos de troponina, que ao se encontrarem em valores acima do percentil 99 do valor superior de referência, podem estar associados à mortalidade. Por essa mesma razão, pensa-se que a lesão miocárdica pode ser a principal causa na origem da mortalidade verificada nestes doentes (Del Turco et al., 2020).

#### **1.4. Vacinas COVID-19**

A vacinação é um processo de administração de vacinas, que são substâncias criadas para estimular o sistema imunológico a produzir uma resposta de defesa contra determinadas doenças. A vacinação é uma das intervenções mais eficazes e bem-sucedidas da medicina moderna, tendo contribuído significativamente para a prevenção e erradicação de várias doenças. Quando uma pessoa é vacinada, uma versão enfraquecida, inativada ou fragmentos de um agente patogénico específico são introduzidos no corpo. Isso desencadeia uma resposta do sistema imunológico, que produz anticorpos e células de memória para combater o agente patogénico real, caso a pessoa seja exposta a ele no futuro. Dessa forma, a vacinação ajuda a proteger o indivíduo vacinado contra a doença e também contribui para a proteção coletiva, reduzindo a disseminação da doença na comunidade. A vacinação é, geralmente, recomendada para todas as faixas etárias, desde o nascimento até a idade adulta. Existem programas de imunização estabelecidos pelos governos em muitos países, nos quais determinadas vacinas são fornecidas gratuitamente para a população.

Vários esforços foram feitos pela comunidade científica para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas anti-COVID-19, acelerando o desenvolvimento de vacinas e disponibilizando-as em tempo recorde (Bonanni et al., 2021). A vacinação é uma importante medida de saúde pública para o controlo e prevenção da doença COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, cujo objetivo é fornecer imunidade humoral protetora, de maneira a prevenir o surgimento da doença grave e das suas consequências, reduzindo a pressão exercida sobre o sistema de saúde (Guiomar et al., 2022a; Serviço Nacional de Saúde, 2022a). Efetivamente, as vacinas COVID-19 mostraram ser uma estratégia profilática eficaz para controlo e prevenção, reduzindo assim hospitalizações e mortes por COVID-19 (Bonanni et al., 2021; Moghadas et al., 2021).

A Direção Geral de Saúde (DGS) e o Ministério da Saúde definiram um plano de vacinação, que é atualizado em função da evolução do conhecimento científico, da situação epidemiológica e das indicações e contraindicações das vacinas, de acordo com parecer da Comissão Europeia e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (Serviço Nacional de Saúde, 2022b). Em Portugal, o processo de vacinação contra a COVID-19 teve início a 27 de dezembro de 2020 (Presidência de República, 2020b), sendo que no mês de outubro de 2021 foi adicionado ao programa de vacinação primário já existente uma dose de reforço (“3ª dose”) da vacina COVID-19 (Serviço Nacional de Saúde, 2021). As 4 vacinas anti-COVID-19, que estavam a ser administradas em Portugal até a data deste estudo, eram: mRNA BNT162b2 (Comirnaty®, anteriormente designada de Pfizer-BioNTech), mRNA-1273 (Spikevax®, anteriormente designada de COVID-19 Vaccine Moderna®), que utilizam uma nova metodologia de imunização, baseada em RNA mensageiro (mRNA); as vacinas, ChAdOx1 nCoV-19 (Vaxzevria®, Oxford-AstraZeneca University, anteriormente designada de COVID-19 Vaccine AstraZeneca) e a Ad26.COV2-S (COVID-19 Vacina Janssen®, Janssen-Cilag) que utilizam vetores adenovirais (Comissão Europeia, 2022a; Infarmed, 2021). Estas têm como principal alvo a proteína S do vírus SARS-CoV-2, uma vez que o RBD da subunidade S1 desta proteína, é considerado o principal alvo para anticorpos de ligação e neutralização (Guiomar et al., 2022a). Estas vacinas foram aprovadas pela Comissão Europeia e pela EMA na sequência de uma avaliação positiva relativamente à sua segurança e eficácia (Comissão Europeia, 2022b).

Atualmente, em Portugal, considera-se que uma pessoa tem vacinação completa ou esquema vacinal completo, após a administração de uma dose única, para vacinas COVID-19 com um esquema vacinal de uma dose, (Ad26.COV2-S-COVID-19 Vacina Janssen®); após a administração de duas doses para vacinas COVID-19 com um esquema vacinal de duas doses, mesmo que tenham sido administradas doses de duas vacinas distintas (mRNA BNT162b2 -Comirnaty®, mRNA-1273-Spikevax® e ChAdOx1 nCoV-19 -Vaxzevria®), e por último, após a administração uma dose única de uma vacina contra a COVID-19 com um esquema vacinal de duas doses por pessoas com história de infeção por SARS-CoV-2 (Serviço Nacional de Saúde, 2022a, 2022b). Sabe-se que atualmente foi adicionada mais doses de reforço.

A estratégia de vacinação definiu grupos prioritários para a toma da vacina seguindo-se, à posteriori, para a restante população, uma vacinação progressiva por idade

e fatores de risco para COVID-19 (Serviço Nacional de Saúde, 2022a). Dos grupos prioritários (Presidência de República, 2020a), fazem parte aqueles com maior risco de complicações, como idosos, em particular utentes em estruturas residenciais para pessoas idosas, pessoas imunocomprometidas, e aqueles com alto risco de exposição e transmissão, como profissionais de saúde (Guiomar et al., 2022a; Serviço Nacional de Saúde, 2022a).

### **1.5. Variantes de SARS-CoV-2**

Quando um vírus circula amplamente numa população e causa muitas infeções, a probabilidade de o vírus sofrer mutação aumenta. Quanto mais oportunidades um vírus tem de se espalhar, mais ele se replica e mais oportunidades ele tem de sofrer mudanças. A maioria das mutações virais tem pouco ou nenhum impacto na capacidade do vírus de causar infeções e doenças. Mas dependendo de onde as alterações estão localizadas, no material genético do vírus, elas podem afetar as propriedades de um vírus, como a transmissão (por exemplo, pode espalhar-se mais ou menos facilmente) ou gravidade (por exemplo, pode causar doenças mais ou menos graves). Espera-se que as vacinas COVID-19, que estão em desenvolvimento ou foram aprovadas, forneçam pelo menos alguma proteção contra novas variantes do vírus, porque essas vacinas provocam uma ampla resposta imune envolvendo uma gama de anticorpos e células. Portanto, alterações ou mutações no vírus não devem tornar as vacinas completamente ineficazes. No caso de qualquer uma dessas vacinas provar ser menos eficaz contra uma ou mais variantes, será possível alterar a composição das vacinas para proteger contra essas variantes (World Health Organization, 2023b).

No final de 2020, com o surgimento de variantes que representavam um risco maior para a saúde pública global, a OMS solicitou a caracterização de Variantes de Interesse (do inglês *variant of interest*; VOIs) e Variantes de Preocupação (do inglês *variant of concern*; VOCs) específicas, a fim de priorizar a monitorização e a pesquisa globais e, em última instância, informar com maior clareza a resposta em andamento à pandemia de COVID-19 (World Health Organization, 2023a).

Assim, desde o aparecimento do SARS-CoV-2, as VOCs do SARS-CoV-2, foram identificadas, pela OMS, levantando questões sobre prevenção, tratamento e eficácia da vacina para a COVID-19 (World Health Organization, 2022).

As VOCs, por meio de uma avaliação comparativa, demonstraram estarem associadas, a uma ou mais das seguintes alterações, num grau de significância para a saúde pública global, tais como o aumento da transmissibilidade ou alteração prejudicial na epidemiologia da COVID-19, o aumento da virulência ou mudança na apresentação clínica da doença e a diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis (World Health Organization, 2023a).

No entanto, o surgimento de VOCs do SARS-CoV-2 que apresentam mutações, principalmente na proteína S do vírus, levantou a questão, quanto à proteção gerada pelas vacinas anti-COVID-19, visto que estas têm como principal alvo a proteína S do SARS-CoV-2 (Garcia-Beltran et al., 2021; Michelon, 2021). No decorrer da pandemia, as duas VOCs de maior preocupação foram a variante Delta (B.1.617.2) e a variante Ómicron (B.1.1.529) (World Health Organization, 2022), devido à sua alta transmissibilidade e aumento da virulência (Cascella et al., 2020; Papanikolaou et al., 2022).

A variante Delta é uma variante do vírus causador da COVID-19. Foi inicialmente descrita na Índia, em outubro de 2020, mas espalhou-se rapidamente por todo o planeta, aumentando o número de casos e internamentos por COVID-19. Em agosto de 2021, a Delta já estava presente em 135 países. Esta destaca-se por possuir uma mutação na região do genoma responsável por produzir a proteína S. Essa mutação faz com que essa proteína apresente uma maior capacidade de adesão às células humanas, o que aumenta a capacidade de infecção. Além disso, essas mutações são responsáveis por causar modificações nessas proteínas, dificultando a ação do nosso sistema imunológico. Além de ser mais contagiosa, a variante Delta destaca-se por provocar um maior risco de hospitalização e levar ao adoecimento mais rápido. A Delta é especialmente preocupante para os não vacinados, os quais tendem a apresentar sintomas mais graves que as pessoas vacinadas (Hart et al., 2021; Hsu et al., 2022).

A Ómicron é uma variante do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19. Foi identificada pela primeira vez na África do Sul, a 24 de novembro de 2021, tem como uma de suas características mais marcantes, a grande quantidade de mutações, sendo algumas delas muito preocupantes. A variante destaca-se ainda pela sua grande capacidade de transmissão, habilidade em escapar do sistema imunológico e possuir um risco aumentado de reinfeção. Devido as suas características, a Ómicron foi decretada como uma VOC pela OMS. As variantes Alfa, Beta, Gama e Delta são também

classificadas como de preocupação (Islam & Hossain, 2022; World Health Organization, 2023a).

Os estudos de neutralização indicam que a variante Ómicron pode ter menos probabilidades de proteção imunitária de uma infecção anterior, em comparação com os VOCs anteriores, o que pode explicar a sua maior infeciosidade. No entanto, os primeiros relatórios clínicos da África do Sul e da América do Norte sugerem que a infecção pela variante Ómicron pode estar associada a um menor risco de hospitalização e a uma doença menos grave em comparação com a variante Delta (Butt et al., 2022).

## **1.6. Métodos para estudo da Imunidade Humoral**

Com a identificação da síndrome respiratória aguda grave causada pelo SARS-CoV-2, em dezembro de 2019, e a rápida caracterização do genoma completo do vírus, a indústria de produtos para diagnóstico *in vitro* mobilizou-se rapidamente para a produção em larga escala de métodos de diagnósticos. Inicialmente, além dos métodos moleculares para a identificação do vírus, foram produzidos exames chamados sorológicos para a identificação de anticorpos das Imunoglobulinas A, M, G (IgA, IgM, IgG) e totais. Posteriormente, surgiram os imunoenaios para detecção de antígeno (Ag) viral. Estes imunoenaios, principalmente os imunocromatográficos, possibilitaram a testagem em massa na população (Uhteg et al., 2020).

Assim, existem diferentes testes de diagnósticos, os diretos, que são aqueles que detetam o RNA ou um antígeno viral, por outro lado, os indiretos, que detetam os anticorpos contra o vírus num indivíduo que foi exposto. A figura 6 ilustra os principais métodos laboratoriais para diagnóstico da doença causada pelo SARS-CoV-2 (Cheng et al., 2020).

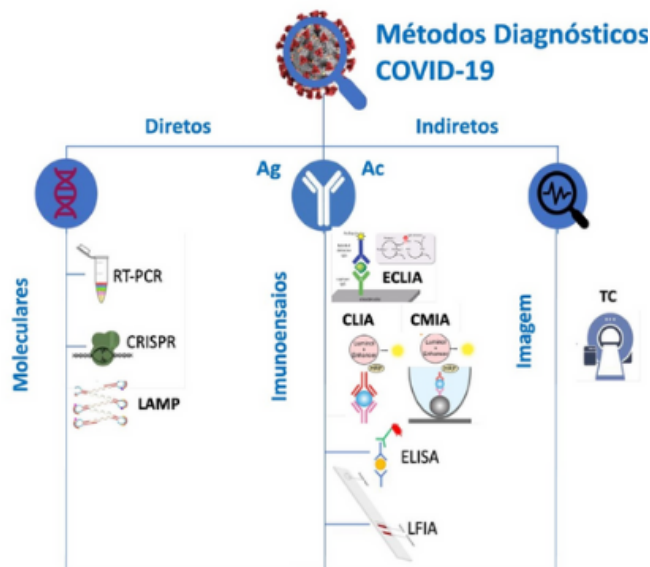


Figura 6-Principais métodos para diagnóstico para SARS-CoV-2; Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR); Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR); amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP); Imunoensaio enzimático (ELISA); imunoensaio de fluxo lateral (LFIA); imunoensaio de quimiluminescência (CMIA); imunoensaio de eletroquimiluminescência(ECLIA); antígeno (Ag); anticorpo (Ac); tomografia computadorizada (TC); (Flávia Martinello, 2021)

Dentro dos métodos de diagnóstico apresentados, alguns deles são igualmente utilizados para a avaliação da imunidade a este vírus, sendo os de imunoensaios.

Por outro lado, os métodos de referência para a detecção de anticorpos contra determinado vírus são os testes de neutralização, sendo este um exame de carácter quantitativo, que visa avaliar e acompanhar a resposta imunológica de proteção pós-vacinação ou de infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Contudo, o diagnóstico do anticorpo de neutralização (NAbs) SARS-CoV-2 precisa de ser explorado para um diagnóstico exato e fiável. Vários ensaios imunoenzimáticos e outros ensaios de teste de NAbs, tais como ensaios imunoenzimáticos baseados na quimioluminescência e ensaios de fluxo lateral (diagnóstico rápido), estão agora disponíveis em diferentes fabricantes (K. T. Liu et al., 2022).

### 1.6.1. Métodos de Análise qualitativa e quantitativa de anticorpos

Estudos em pré-publicação ou publicados recentemente têm permitido uma compreensão crescente sobre a dinâmica da resposta humoral após a infecção por SARS-

CoV-2, sugerindo até que esta possa ser semelhante à das infecções pelo SARS-CoV e MERS-CoV.

A maioria dos doentes com infecção confirmada por reação da transcriptase reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (do inglês *reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) apresentam seroconversão entre o 10º e o 14º dia, após o início de sintomas. No entanto, os dados sobre se estes anticorpos conferem proteção contra uma nova infecção e qual é a sua duração, são atualmente limitados e continuamente estudados.

Quando se revê a literatura sobre a resposta humoral da COVID-19, um dos cuidados prende-se com o facto de diferentes estudos usarem diferentes métodos serológicos, muitos deles ainda não validados comercialmente e sem uma boa sensibilidade ou especificidade para responder a todas questões sobre a cinética da resposta humoral na infecção pelo SARS-CoV-2 (Ceia et al., 2021).

### ***Métodos Serológicos***

Existem dois tipos de testes rápidos, aqueles que detetam proteínas na fase ativa da infecção, conhecidos como teste de antigénio (TRAg), e aqueles que identificam a presença de anticorpos, que são produzidos por uma resposta imunológica do organismo quando exposto ao vírus.

Apesar de amplamente difundidos, os TRAg (Figura 7), quando realizados fora do período indicado, podem apresentar sensibilidade e especificidade muito reduzidas e taxa de erro de 75% de resultados falso negativo, acarretando insegurança e incerteza para interpretação diagnóstica (M. Oliveira et al., 2022). Considerando que nem todos os indivíduos infetados pelo vírus apresentam anticorpos detetáveis por esses métodos, principalmente indivíduos assintomáticos ou que desenvolvem quadro leve de infecção, é importante realizar o diagnóstico por meio de metodologias mais precisas e confiáveis, como a RT-PCR. Embora esses testes não sejam apropriados para o diagnóstico precoce da infecção pelo SARS-CoV-2, eles podem auxiliar no diagnóstico de inflamação multissistêmica relacionada à COVID-19 (Long et al., 2020).

Os testes rápidos de Anticorpo (figura 7) foram elaborados baseando-se num sistema qualitativo de deteção de anticorpos IgG/IgM.

Estes testes utilizam uma amostra sanguínea obtida com uma pequena picada na pele e o resultado é obtido através duma tira de teste. Os resultados são apresentados entre 15 e 20 minutos.

Estes testes continuam ainda a ser alvo de estudo por várias entidades de forma a serem cada vez mais úteis clinicamente, para dar as respostas necessárias às dúvidas de forma rápida e fidedigna. São utilizados para rastreios gerais e, principalmente, em casos suspeitos ou que tiveram contactos indirectos com casos positivos. Estes testes não devem ser utilizados como métodos de diagnóstico por si só (Farmácia Portugal, 2023).

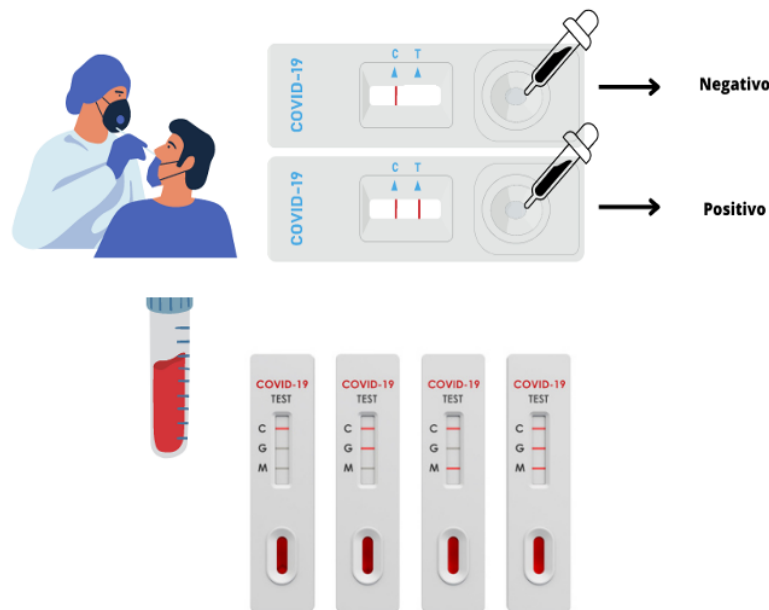


Figura 7- Teste Rápido de Antígeno e Anticorpos; Negativo: não se pode afirmar que não esteja infetado; IgM+: fase aguda, pode transmitir; IgG+: fase crônica, já foi exposto; IgM+/IgG+: contacto recente, início da memória imunológica;

A deteção de anticorpos ou de IgA, IgM e IgG em pessoas que foram expostas ao SARS-CoV-2 é realizada a partir da amostra de sangue do paciente, a IgM é identificada a partir do quinto dia de sintomatologia e, mais significativamente, a partir do oitavo dia, enquanto os valores de IgG específica começam a ser detetáveis a partir do décimo dia do início dos sintomas e, mais significativamente, a partir do décimo quarto dia (Deeks et al., 2020).

Os exames serológicos podem ser usados como ferramentas auxiliares para diagnóstico de infeção prévia e para estudos populacionais, porém, deve-se avaliar primordialmente alguns parâmetros como validação e acurácia do teste, seleção da

amostra e a interpretação dos resultados. Além disso, eles não devem ser utilizados como método de diagnóstico preciso, na identificação e controlo de surtos entre profissionais de saúde, pois não fornecem informações no que diz respeito ao período de ineficiência ou transmissibilidade da infeção (M. Oliveira et al., 2022).

Além dos testes rápidos, a quantificação de IgG e IgM pode ser realizada também pelo método de imunoabsorção enzimática conhecido como ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o qual, assim como o método de Quimioluminescência (do inglês, *Chemiluminescence Immunoassay*, CLIA) são testes serológicos realizados por técnicas de análise automatizadas e convencionais (M. Oliveira et al., 2022). Métodos mais recentes como Eletroquimioluminescência (ECLIA) também estão disponíveis para deteção de anticorpos totais ou apenas para IgG. Esses métodos apresentam sensibilidade superior ao teste rápido na deteção dos anticorpos, porém, assim como o teste rápido, a acurácia destes ensaios é dependente da época em que a colheita é realizada, cujas recomendações são a partir do 10º dia do início dos sintomas para IgM e IgA e após 15º dia para IgG (Hoffman et al., 2020; M. Oliveira et al., 2022).

O método ELISA tem sido amplamente utilizado em alguns países da Europa e nos Estados Unidos para a avaliação da seroprevalência dos anticorpos IgG em populações suscetíveis, cujos resultados concluíram que muitas populações possuíam níveis significativos de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2. Esses resultados podem ajudar a entender a probabilidade de infeções assintomáticas ou infeções com sintomas leves (Levesque & Maybury, 2020). Esse método é um ensaio valioso na elucidação de diagnósticos virais, uma vez que, fornece informações qualitativas e quantitativas, a partir de amostras de sangue total, plasma ou soro. Esse ensaio utiliza uma placa revestida com proteína viral, onde as amostras são incubadas e, quando na presença de anticorpos, ocorre uma ligação destes anticorpos com uma proteína específica, formando um complexo proteína-anticorpo e, dessa forma, pode ser detetado pela ligação a um novo lote de anticorpos fluorescentes. Informações da agência reguladora americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) indicam que esse teste é um auxílio no diagnóstico de pacientes com suspeita de COVID-19, em conjunto com a informação clínica e os resultados de outros testes laboratoriais. Portanto, não devem ser usados como única base para o diagnóstico de pacientes com infeção aguda por COVID-19. O teste de anticorpo IgG, pelo método ELISA consiste em dois ensaios diretos e em série: o primeiro é realizado contra o domínio de ligação ao recetor recombinante de SARS-CoV-2 no soro

e plasma, o segundo, é realizado para amostra contendo o anticorpo, e é empregue um ensaio ELISA confirmatório contra a proteína S do SARS-CoV-2 de comprimento total no soro e plasma. Uma importante variável na aplicação de testes serológicos em diagnósticos virais é o tempo médio de seroconversão para os anticorpos avaliados (M. Oliveira et al., 2022).

Uma pesquisa realizada na China, com mais de 200 amostras, resultou na informação de que o teste ELISA IgM combinado com RT-PCR aumentou, substancialmente, na detecção da infecção causada pelo SARS-CoV-2 (98,6%), quando comparada com único teste de RT-PCR (51,8%). Entretanto, ao que tange à especificidade, ainda existem algumas preocupações em relação a reatividade cruzada com o vírus da COVID-19 e outros coronavírus como SARS-CoV e MERS-CoV. Dessa forma, foram desenvolvidos testes pelo método ELISA capazes de detetar anticorpos contra as proteínas N e S, que são as principais proteínas imunológicas do coronavírus, cujos resultados evidenciam que a proteína N (compartilha 92% de sua sequência de aminoácidos com o SARS-CoV) e a RBD (compartilha 73%) foram mais específicas para o SARS-CoV-2 do que a proteína S. Assim, esses resultados podem ser úteis para elucidar resultados falso-negativos (M. Oliveira et al., 2022; Ren et al., 2020).

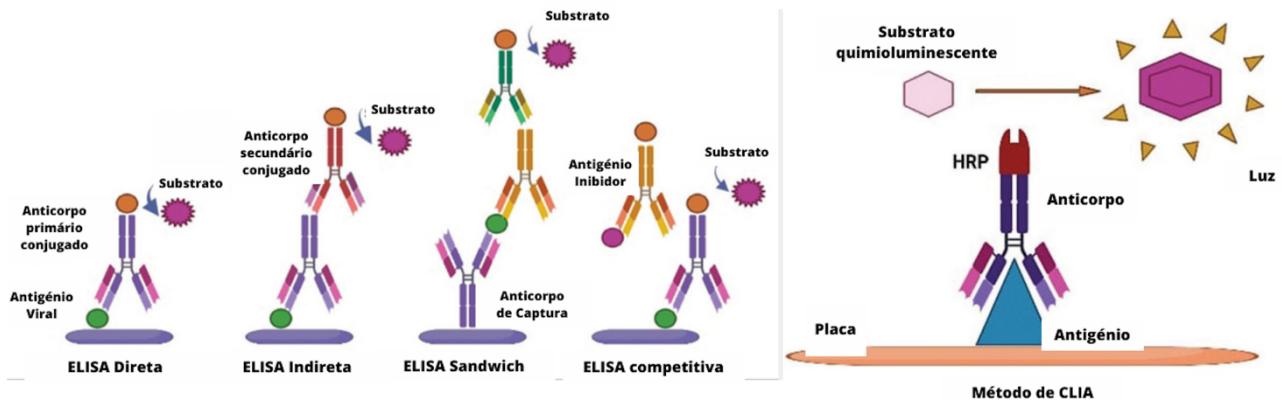


Figura 8- Métodos de ELISA e o método CLIA adaptado de (Khan et al., 2023)

O método CLIA (Figura 8), que também é utilizado na detecção de títulos de anticorpos IgM e IgG em pessoas expostas ao SARS-CoV-2, apresenta sensibilidade relativamente menor que o RT-PCR. Esse método é caracterizado como uma tecnologia de alto rendimento e baixa complexidade e fornece informações sobre níveis de

anticorpos e cinética de tempo da resposta humoral, que podem ser aplicadas no diagnóstico da COVID-19. Embora ainda tenha muitas limitações, muita pesquisa tem sido investida nesta tecnologia visando obter maior sensibilidade para aplicação no diagnóstico da COVID-19 (Infantino et al., 2020).

### ***Métodos Moleculares***

O diagnóstico molecular ou baseado em ácido nucleico de doenças humanas pode ser compreendido como a detecção de variações genéticas em amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou RNA. Considerando esse tipo de diagnóstico, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAANs), aqueles que realizam a identificação de sequências específicas do material genético do agente patogénico nas amostras dos pacientes suspeitos, são recomendados para o diagnóstico da COVID-19, conforme as diretrizes da OMS, e atualmente o "método padrão ouro" é o conhecido RT-PCR, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Estes testes são feitos por profissionais de saúde que recolhem uma amostra de produto (exsudado) através do nariz (até à nasofaringe), com recurso a uma zaragatoa, esta amostra é posteriormente analisada num laboratório certificado para o efeito. O teste PCR permite que as pessoas possam ter a confirmação se estão ou não infetadas, para que possam receber o acompanhamento e tratamento adequado e tomar as medidas necessárias para não infetarem outras pessoas (Habibzadeh et al., 2021; M. Oliveira et al., 2022).

No que diz respeito à sensibilidade dos testes de detecção de anticorpos no diagnóstico do SARS-CoV-2, independentemente da presença ou ausência destes anticorpos no indivíduo, deve-se avaliar as características das técnicas utilizadas como desempenho do teste, sensibilidade analítica (limite de detecção) e a especificidade analítica (menor interferência de outras substâncias ou antígenos), tendo em vista que muitas variáveis provenientes da fase pré-analítica como o método de colheita, conservação e transporte da amostra podem influenciar diretamente no resultado do exame (M. Oliveira et al., 2022).

No âmbito dos testes de diagnósticos para COVID-19, utilizando o RT-qPCR, o primeiro protocolo foi criado pela OMS no início de 2020. Esse protocolo consistia em três etapas, cuja etapa inicial permitia identificar o gene E (proteína de pequeno envelope), com um limite de detecção de 5,2 cópias de RNA/reacção e um intervalo de confiança (IC) de 95% de 3,7-9,6. As próximas etapas consistiam em testes

confirmatórios, que visavam detetar o gene RNA-polimerase, dependente de RNA (Limite de deteção de 3,8 cópias de RNA/reacção e IC de 95% de 2,7-7,6) e o gene N (Limite de deteção de 8,3 cópias de RNA/reacção e IC de 95% de 6,1-16,3 (Corman et al., 2020; Udugama et al., 2020).

Uma alternativa ao RT-qPCR em tempo real é a abordagem para deteção consideravelmente rápida do SARS-CoV-2, conhecida como amplificação isotérmica mediada por LAMP (do inglês *mediated isothermal amplification*). Possui maior custo e maior benefício quando comparado às técnicas convencionais de amplificação de ácidos nucleicos, como PCR e RT-PCR, tendo em vista a redução do custo envolvido considerando os reagentes e instrumentos utilizados no processo (Kashir & Yaqinuddin, 2020). Neste método, o processo de amplificação do DNA ocorre à temperatura constante, cerca de 60-65°C numa hora, suprimindo o uso de termocicladores (Corman et al., 2020; Udugama et al., 2020).

Desde o seu desenvolvimento nos anos 2000, este método de amplificação isotérmica de ácido nucleico já era capaz de gerar cópias do DNA, na escala de  $10^9$ , com alta especificidade. Desde então, inúmeras reacções baseadas em LAMP foram desenvolvidas para a deteção de diversos patógenos, visando o diagnóstico clínico de doenças infecciosas (Mori et al., 2013).

### **1.6.2. Testes de Neutralização**

Os testes de neutralização medem a capacidade dos anticorpos presentes numa amostra de soro, para impedir a infeção de células suscetíveis por uma carga padronizada de vírus. No entanto, devido à manipulação de vírus altamente patogénicos, o seu uso implica a existência de condições de biossegurança de nível 3. Uma das alternativas envolve a utilização de partículas virais pseudotipadas com o antigénio recombinante de interesse, como a proteína S do vírus SARS-CoV-2, e cujo genoma codifica uma enzima reportadora, de que é exemplo a luciferase. As células suscetíveis (que expressam o recetor para a proteína S) e que são “infetadas” pelo pseudovírus incorporam esta enzima no seu genoma, sendo a sua expressão proporcional ao número de células transduzidas. Uma vez que são utilizados pseudovírus, estes ensaios de neutralização podem ser feitos em laboratórios de biossegurança de nível 2. A atividade neutralizante é medida com a dose inibitória a 50% (ID50), ou seja, a diluição mais alta de plasma contendo anticorpos

contra SARS-CoV-2 responsável por uma redução em 50% da luminescência da enzima luciferase em comparação com o controlo (Lopes, 2021).

Os testes de imunoabsorção enzimática, a ELISA e os testes imunocromatográficos de fluxo lateral permitem a deteção de anticorpos presentes contra determinado antigénio. Enquanto os primeiros permitem quantificar o título de anticorpos presentes, os segundos são meramente qualitativos. Nenhum dos dois permite saber se os anticorpos presentes são protetores, ou seja, não avaliam a sua atividade neutralizante (Ceia et al., 2021).

Os NAbs são gerados nas semanas seguintes à imunização ou infeção e podem proporcionar imunidade protetora. Assim, a produção de NAbs é o objetivo principal da vacinação contra o SARS-CoV-2 e os NAbs podem ser utilizados no tratamento de doentes, sob a forma de anticorpos monoclonais. Até à data, a deteção de NAbs tem sido importante no desenvolvimento de vacinas e na determinação da prevalência do vírus, para ajudar o governo a ajustar as decisões políticas (Figura 9) (Ceia et al., 2021).

Estes ensaios de neutralização são considerados o “padrão de ouro” para avaliar a imunidade contra o SARS-CoV-2 (K. T. Liu et al., 2022).

Estima-se que o grau de especificidade deste teste é de 96,5%, portanto, é um ótimo índice para apurar se os anticorpos são capazes de bloquear, consistentemente, a interação com o vírus. O teste mais utilizado é o do método ELISA e consiste em verificar reações do antigénio mediante a uma resposta enzimática. Isto é, quando se adiciona o substrato apropriado, há uma alteração na cor e ocorre a reação do antigénio, a fim de evidenciar a concentração de anticorpos na amostra. Para a obtenção de resultados ainda mais precisos, a recomendação é que a colheita de sangue seja realizada depois de 21 dias do estado clínico inicial (Meyer et al., 2020; Taylor et al., 2021).

A nível de resultado do teste, vale ressaltar que nem todos os anticorpos representam necessariamente a neutralização viral, ou imunização, isso é claro em relação ao teste serológico, que apresenta os níveis de anticorpos totais, mas que não são específicos no que se refere ao bloqueio. Na análise, espera-se que os anticorpos sejam eficazes em romper a ligação entre o RBD, proteína S e o recetor ACE2 das células humanas. Com dados em números percentuais, a classificação dos resultados é mostrada em três categorias: não reagentes (negativos), indeterminados e reagentes (positivos) (Meyer et al., 2020; Tan et al., 2020; Taylor et al., 2021).

Por outras palavras, se o valor for inferior a 20%, indica a ausência de anticorpos com potencial neutralizador, mas não necessariamente exclui o contato com o vírus. Na faixa entre 20% e 30%, o resultado é indeterminado e deve ser analisado com muita cautela, tendo como base outros dados epidemiológicos e clínicos. Todavia, o resultado reagente com valor igual ou acima de 30% pode indicar a presença dos anticorpos neutralizantes e, com isso, a proteção imunológica.

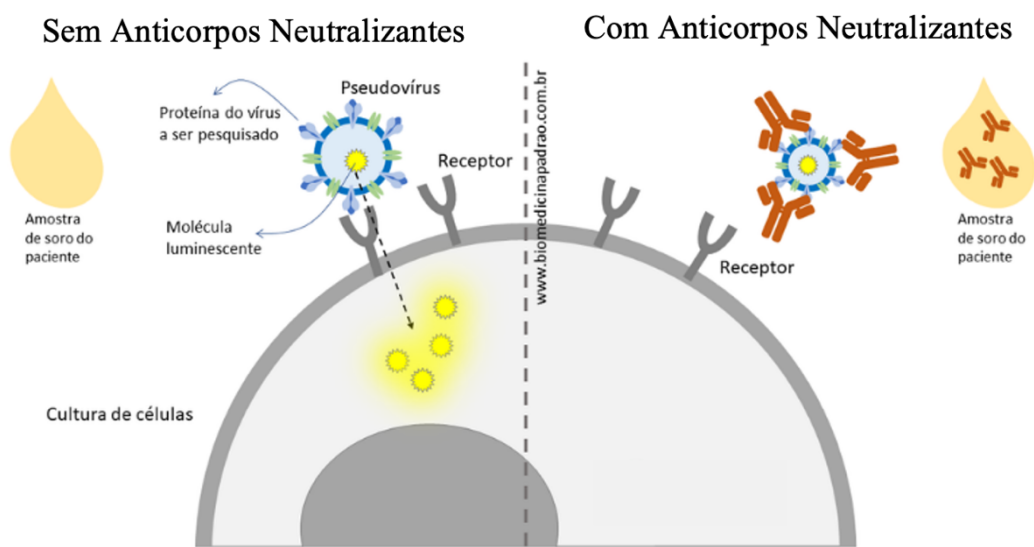


Figura 9- Neutralização SARS-CoV-2 adaptado de (Câmara, 2021)

Contudo, esta metodologia apresenta algumas limitações por conta da falta de padronização dos kits entre os principais fabricantes. Diferentes antígenos e unidades de medida costumam ser utilizados como diagnóstico.

Vale a pena ressaltar que não existem dados ainda muito concretos relacionados ao período de permanência e proteção dos anticorpos neutralizantes na circulação. Alguns estudos mostram que os pacientes que apresentam anticorpos após infecção por SARS-CoV-2 podem permanecer imunes a novas infecções por um período mínimo de 6 meses. Também não existe ainda correlação concreta com os valores quantitativos reportados nos testes de anticorpos com o grau de proteção e existe uma dinâmica na produção de anticorpos que, após atingir o seu pico, retorna para um valor que pode não ser muito elevado, mas que, também não necessariamente indica diminuição no grau de proteção.

Portanto, mesmo resultados positivos podem não assegurar proteção duradoura e os cuidados com medidas de proteção individual, distanciamento social e higiene, devem ser

mantidos, mesmo para os pacientes com resultados positivos para anticorpos contra o SARS-CoV-2, conforme retificado por diversas instituições científicas (Lumley et al., 2021; Meyer et al., 2020; Tan et al., 2020).

### **1.7. Importância dos estudos de avaliação da Imunidade na COVID-19**

Efetivamente, foram realizados muitos estudos epidemiológicos sobre a imunidade à COVID-19 desde o início da pandemia. Esses estudos têm sido cruciais para entender a resposta imunológica ao vírus e fornecer informações importantes para orientar as estratégias de controlo da doença. Os estudos de avaliação da imunidade na COVID-19 desempenham um papel fundamental na compreensão e gestão da pandemia. Um dos motivos pelo qual esses estudos são importantes, é para avaliar a imunidade natural.(OPAS, 2021) De facto, vários estudos analisaram a presença de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 na população em geral e têm fornecido estimativas da proporção de pessoas que foram infetadas e desenvolveram uma resposta imune detetável. Os resultados sugerem que uma parcela significativa da população pode ter sido infetada sem apresentar sintomas ou com sintomas leves, sendo necessário saber também a durabilidade desta imunidade, pois estudos longitudinais têm acompanhado indivíduos infetados pelo SARS-CoV-2 ao longo do tempo para avaliar a duração da imunidade. Embora a resposta imunológica possa variar entre as pessoas, esses estudos indicam que a maioria dos indivíduos infetados desenvolve uma resposta de anticorpos que persiste por vários meses. No entanto, ainda existe incertezas sobre quanto tempo essa imunidade pode durar (Silva de Sordi et al., 2020).

Ainda assim, é necessário saber a eficácia da vacinação, ou seja, a avaliação da imunidade é crucial para determinar a eficácia das vacinas COVID-19. Esses estudos permitem monitorizar a resposta imunológica induzida pelas vacinas e avaliar se elas são capazes de fornecer proteção adequada contra o vírus. Além disso, eles podem ajudar a identificar possíveis variantes do vírus que podem afetar a eficácia das vacinas. E ainda compreender a duração da resposta imunitária pós-vacinal, por outras palavras ajudam a entender a duração da imunidade, que é essencial para orientar a implementação de estratégias de vacinação e planear campanhas de reforço. Os estudos longitudinais podem fornecer informações sobre por quanto tempo a proteção imunológica dura após a infeção ou vacinação e se são necessárias doses adicionais. Auxiliam a perceber a resposta imunológica em diferentes grupos populacionais, ou seja, a avaliação da imunidade permite investigar se certos grupos populacionais têm respostas imunológicas diferentes,

como idosos, crianças, indivíduos imunocomprometidos ou aqueles com condições médicas subjacentes. Isso é importante para determinar que grupos podem estar em maior risco de infecção grave e tomar medidas específicas para protegê-los (Guiomar et al., 2022b; OPAS, 2021). A monitorização da disseminação do vírus pode, igualmente, ser avaliada, pois os estudos de imunidade podem fornecer informações sobre a disseminação do vírus numa determinada população. Eles podem ajudar a identificar pessoas que foram previamente infetadas e desenvolveram imunidade, mesmo que sejam assintomáticas ou tenham tido uma infecção leve. Isso é especialmente relevante para entender a proporção de infeções não detetadas e avaliar o progresso da imunidade coletiva. Com o surgimento de variantes do vírus, os estudos têm investigado se as respostas imunológicas geradas pela infecção natural ou vacinação são capazes de fornecer proteção contra essas variantes. Também têm sido realizados estudos para entender o impacto das variantes na transmissibilidade e gravidade da doença (World Health Organization, 2021).

Os estudos para avaliação da imunidade auxiliam no desenvolvimento de estratégias de controlo da pandemia, com base nos resultados dos estudos de imunidade desde a eficácia das vacinas até ao desenvolvimento de novas medidas, como restrições de viagem, diretrizes de distanciamento social e priorização de grupos populacionais para a vacinação. Em resumo, é importante destacar que a pesquisa sobre a imunidade à COVID-19 é um campo em constante evolução e novas investigações estão em desenvolvimento (Cristóvão et al., 2020).

## **CAPÍTULO II – OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi determinar *status* imunológico através da análise de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 numa amostra constituída por Profissionais de Saúde da Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) de Bragança e em utentes de lares da mesma região. A análise foi realizada em dois momentos diferentes como forma de avaliar a proteção gerada pela vacinação. A primeira análise serológica (T1) foi realizada no período anterior à administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19 (também chamada de 3ª dose) e a segunda análise, análise (T2), no período anterior à 2ª dose de reforço. Pretendeu-se desta forma avaliar o status imunológico imediatamente anterior à administração das vacinas, comparando os dois momentos de avaliação.

Como objetivos específicos:

- Identificar a proporção de participantes com presença de anticorpos (reatividade à vacina e/ou presença de infeção recente) com base nos pontos de corte para os testes que avaliam a presença de anticorpos específicos, contra a proteína S e N nos dois momentos de observação.
- Comparar os momentos T1 e T2 nos dois grupos estudados e verificar a sua cinética.
- Inferir a proporção de indivíduos com nível de anticorpos que confere proteção.

Assim, os resultados obtidos a partir desta análise preliminar, permitirão delinear futuras metodologias a serem aplicadas numa abordagem prospetiva, de forma a averiguar a real proteção imunitária alcançada.

## **CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. População alvo e desenho do estudo

Foi realizado um estudo prospetivo numa amostra não probabilística de Profissionais da Saúde da Unidade Local de Saúde (ULSNE) de Bragança e de utentes de lares de idosos. A primeira análise sorológica realizou-se entre os dias 17/10/2021 a 30/11/2021 (período T1, primeira análise sorológica) antes da administração da primeira dose de reforço da vacina contra a COVID-19, para idosos e profissionais de saúde. A 2ª colheita (período T2: segunda análise sorológica), realizada antes da 2ª dose de reforço da vacina, ocorreu entre 01/05/2022 e 15/05/2022 para o grupo dos utentes de lares e entre 15/10/2022 a 30/11/2022 para o grupo dos profissionais de saúde (Figura 10).

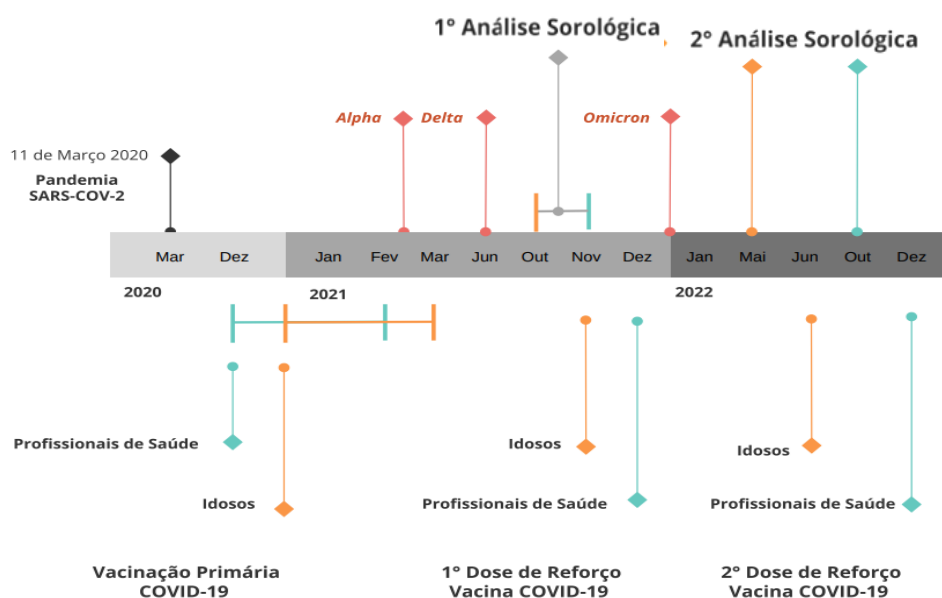


Figura 10: Linha temporal dos principais acontecimentos relacionados com a vacinação, momento da colheita, grupos envolvidos, prevalência de estirpes envolvidas desde março de 2020

### 3.2. Seleção da amostra

Os participantes que integraram a 1ª fase deste estudo serológico foram selecionados para a realização de uma 2ª análise sorológica. Os critérios usados para a seleção dos participantes foram: aceitação para participar nesta 2ª fase do estudo (consentimento), os que apresentavam resultados para os dois anticorpos, devidamente validados na primeira colheita (T1); vacinação com a 1ª dose de reforço no intervalo estipulado pelo Serviço Nacional de Saúde (Figura 11).

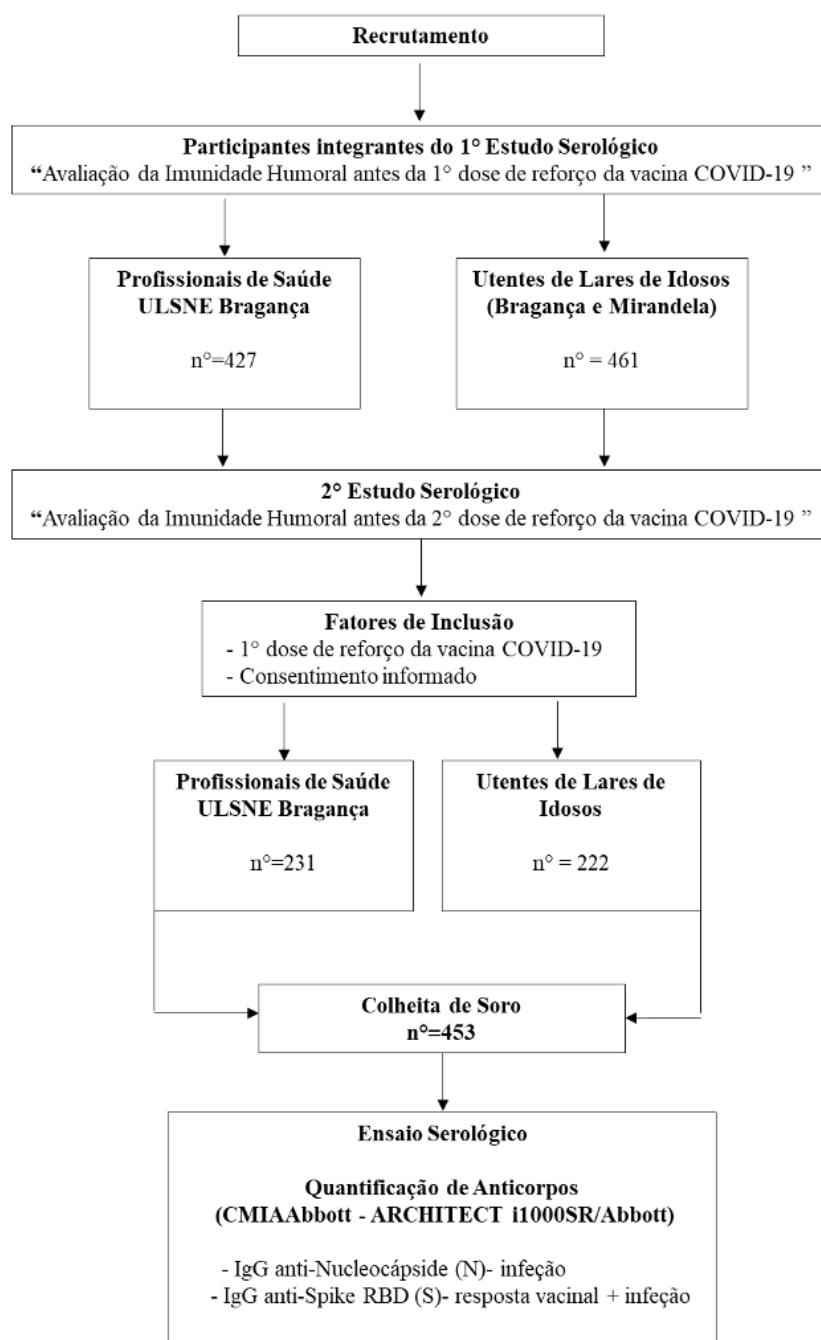


Figura 11- Desenho do Estudo. Fluxograma representando o processo de recrutamento. A ULSNE de Bragança é composta por 900 Profissionais de Saúde e os lares de idosos incluídos no estudo apresentam cerca de 1500 utentes.

### 3.3. Procedimentos laboratoriais

Com base no número de indivíduos que aceitaram participar e que eram elegíveis para participar do estudo, foi preparada uma lista para a colheita de amostras de sangue para as análises serológicas e uma equipa formada por Técnicos de Análises Clínicas do

Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança, juntamente com a equipa de investigação ligada ao projeto NORDETEST-COVID19.

### **3.3.1. Colheita de sangue**

As colheitas de sangue foram realizadas nas instalações do Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança, agendadas de acordo com as datas anteriormente marcadas para a administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19. As amostras foram colhidas por meio de uma punção venosa (3-4 mL) e armazenadas em tubos secos S-Monovette® com gel. Todo o material de colheita foi fornecido pelo Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança. As amostras foram identificadas com etiquetas previamente impressas, considerando a lista de participantes. Essa identificação inclui um código de barras único que contém informações do doente, número do processo e tipo de análise solicitada, e foi realizada por meio do programa SISLAB.

### **3.3.2. Preparação e Armazenamento das Amostras**

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos, seguindo as recomendações do fabricante (Sarstedt & Co, 2022) para separar o coágulo do soro. Após a centrifugação, cerca de 2 mL de soro foi separado e armazenado refrigerado a uma temperatura de 2 a 8 °C por um período máximo de 7 dias antes da análise laboratorial para deteção de anticorpos IgG (Spike) e IgG (Nucleocapsídeo) do SARS-CoV-2. Em seguida, as amostras foram armazenadas congeladas a -20°C, conforme as diretrizes e recomendações do fabricante (Abbott Laboratories, 2022a, 2022b).

### **3.3.3. Análise Serológica**

Para a análise da imunidade humoral foi utilizado um ensaio Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA), Ensaio SARS-CoV-2 IgG II, (IgG anti-S/RBD) e Quant e SARS-CoV-2 IgG (IgG anti-N); Quant, Abbott, fabricante (Abbott Laboratories, 2022b; Galipeau et al., 2020). Este tipo de ensaio utilizado para avaliação da seroprevalência e resposta humoral pós-vacinação (Cristiano et al., 2022; English et al., 2021; Harritshøj et al., 2021). A quantificação de anticorpos, através deste teste (Abbott), permite indiretamente inferir sobre a capacidade de neutralização dos anticorpos presentes no soro dos participantes, uma vez que os resultados obtidos em diversos estudos de comparação de métodos disponíveis para o SARS-CoV-2 demonstraram que há uma correlação linear entre os testes serológicos clássicos e os que

utilizam anticorpos neutralizantes (padrão ouro das metodologias para a quantificação da resposta humoral) (Cristiano et al., 2022; English et al., 2021; Harrithshøj et al., 2021).

### **3.4. Interpretação dos resultados**

As amostras de soro foram inicialmente analisadas usando o ensaio qualitativo Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG (ensaio anti-N), que deteta anticorpos contra a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. Este ensaio possui um valor de índice de 1.4 como limite de positividade. No entanto para a definição dos pontos de corte neste trabalho, baseamo-nos num estudo realizado por Bryan e colegas (Bryan et al., 2020) que determinou que a redução do limite anticorpos anti-N do teste Abbott de 1.4 para 0.7 resultou em um aumento na sensibilidade do teste de 84.2% para 88,0% ( $\geq 7$  dias após o início dos sintomas) e uma diminuição na especificidade do teste de 100.0% para 99.6%. Para podermos detetar o máximo de participantes com contato com o vírus, optamos por escolher o valor de ponto de corte de 0.7 para todas as amostras. Assim, para esta análise, valores de anticorpos anti-N superiores a 0.7 foram considerados positivos, permitindo inferir que foram infectados recentemente.

Na análise quantitativa, os resultados do teste de anticorpos específicos contra a proteína anti-S (Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG II) são expressos em unidades arbitrárias por ml (AU/mL) e foram convertidos para unidades de ligação de anticorpos (BAU/mL), de acordo com a Notificação da OMS (20/136), sobre Conversão de Unidades (RN21040201). O ensaio da Abbott mede a quantidade de anticorpos IgG específicos anti-S numa faixa que vai de 7 AU a um limite máximo de 40.000 AU, correspondendo a uma faixa de 1.0 a 11.360 BAU/mL, obtidos a partir do fator de conversão de 0.142. Neste ensaio Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG II, os resultados podem ser interpretados com base num ponto de corte, onde o resultado é considerado positivo para IgG-S (considerado reativo) quando os valores são iguais ou superiores a 50,0 AU, ou seja, iguais ou superiores a 7.1 BAU/mL após a conversão, de acordo com as especificações do fabricante (Abbott Laboratories, 2022).

Para inferir a proporção de indivíduos com nível de anticorpos que confere proteção, caracterizou-se a amostra com base nos níveis de anticorpos proposto pelo fabricante (Abbott) (David et al., 2021).

### 3.5. Análise estatística

A quantificação do nível de anticorpos anti-S é apresentada como mediana e intervalo inter-quartil (IQR) por não ter distribuição normal (valor-p do teste Kolmogorov–Smirnov <0.001). Para análise qualitativa de anticorpos anti-N e de anticorpos anti-S, calcularam-se frequências absoluta e relativa considerando a variável dicotomizada de acordo com os pontos de corte de 0.7 para anti-N e de 7.1 BAU/mL para anti S (positivo se anti-N>0.7, positivo se anti-S>7.1) A comparação dos níveis de anticorpos entre T1 e T2, foi feita recorrendo a análise emparelhada para variáveis quantitativas (anti-S) e qualitativas (anti-N e anti-S) recorrendo aos testes Wilcoxon-rank test e McNemar, respetivamente. As análises foram feitas separadamente para idosos e profissionais. Em cada um destes grupos foi feita estratificação por género. Foi considerada também o estado de infeção recente (sim e não) tendo em conta o ponto de corte para anti-N, em que valores de anti-N superiores a 0.7 são indicativos de infeção recente. A estratificação por estado de infeção foi considerada na avaliação quantitativa de anti-S. Para cada um dos períodos T1 e T2 comparam-se os grupos de acordo com o género e o estado de infeção utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar diferenças de mediana.

Para a determinação da alteração percentual na mediana de anti-S do Tempo 1 (T1) para o Tempo 2 (T2), foi utilizada a fórmula  $[(\text{anti-S T2} - \text{anti-S T1}) / \text{anti-S T1}] \times 100$ . As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Science, IBM), versão 23 e no programa, disponível online, JASP (versão 17.0) (*JASP (Version 0.17)*, 2023). Considerou-se para um nível de significância um valor inferior a 0.05.

### 3.6. Considerações éticas

O estudo seguiu todas as normas legais e éticas aplicáveis. O protocolo do estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética em Saúde da ULSNE de Bragança, conforme documentado no Anexo I, e está disponível para consulta. Todos os participantes forneceram o seu consentimento por escrito (Anexo II), autorizando a colheita de amostras sanguíneas para análise serológica, bem como a coleta de dados demográficos, sociais e de saúde. Os participantes foram informados sobre os objetivos e a metodologia do estudo, e também foram informados de que as amostras biológicas coletadas poderiam ser utilizadas em pesquisas futuras, relacionadas à determinação do risco de infeção por

SARS-CoV-2. Para preservar a confidencialidade dos dados dos participantes, a cada indivíduo foi atribuído um número interno exclusivo.

## **CAPÍTULO IV – RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da amostra

Dos participantes 231 são profissionais de saúde e 222 são utentes do Lar com mediana etária de 47 (IQR: 40; 57) e 88 anos (IQR: 80; 92), respetivamente. Dos profissionais de saúde, 80.5% (n=186) são mulheres e 41.1% (n=95) foram infetados recentemente. Entre os utentes do Lar, 66.7% (n=148) são mulheres e 45.5 % (n=101) foram infetados recentemente (Tabela 1). Todos os participantes foram vacinados com a primeira dose de reforço. Embora com um pequeno desfasamento cronológico entre os grupos, a colheita realizou-se em média 4 meses da inoculação.

Tabela 1- Caracterização da amostra

		Profissionais de saúde n=231	Utentes do Lar n=222
<b>Género</b> n (%)	<b>homens</b>	45 (19.5)	74 (33.3)
	<b>mulheres</b>	186 (80.5)	148 (66.7)
<b>Idade em anos</b> mediana [IQR]		47 [40; 57]	88 [84; 92]
<b>Infeção</b> n (%)	<b>sim</b>	95 (41.1)	101 (45.5)
	<b>não</b>	136 (58.9)	121 (54.5)

IQR: Amplitude Interquartil.

### 4.2. Determinação qualitativa da reatividade anti-Nucleocapsídeo e anti-Spike do vírus SARS-COV-2

De acordo com os resultados, a proporção de seropositivos para anti-N aumentou significativamente entre T1 e T2, de 36.0% para 72.1% ( $p<0.001$ ) em utentes do lar e de 10.0% para 30.7% ( $p<0.001$ ) nos profissionais de saúde. O aumento da proporção de positividade manteve-se estatisticamente significativa após estratificar por sexo e pela presença de infeção (Tabela 2). É possível estimar o aumento percentual na prevalência de anticorpos anti-N positivos entre o Tempo 1 (T1) e o Tempo 2 (T2) para cada grupo.

O aumento percentual do número de seropositivos estimado para os profissionais de saúde é de 207.0% e para os utentes de lares é de 100.3%. É importante observar que

esses são aumentos significativos, especialmente para os profissionais de saúde, indicando a presença de infecção recente.

Tabela 2- Análise qualitativa dos anticorpos IgGs anti-N nos dois grupos e em diferentes tempos.

		N	Anti N positivo (>0.7)		p*
			T1 n (%)	T2 n (%)	
Utentes do Lar	<b>Total</b>	222	80 (36.0)	160 (72.1)	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Feminino</b>	148	48 (32,4)	105 (70.9)	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Masculino</b>	74	32 (43.2)	55 (74.3)	<b>&lt;0.001</b>
Profissionais de saúde	<b>Total</b>	231	23 (10.0)	71 (30.7)	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Feminino</b>	186	19 (10.2)	54 (29.0)	<b>&lt;0.001</b>
	<b>Masculino</b>	45	4 (8.9)	17 (37.8)	<b>0.002</b>

Testes considerados positivos de acordo com o ponto de corte estabelecido pelo fabricante (análise qualitativa do teste sorológico). T1: Período anterior à toma da primeira dose de reforço da vacina. T2: Período anterior à toma da segunda dose de reforço da vacina. \* Valor-p para o teste McNemar, comparação de proporção de Anti-N positivo entre T1 e T2.

O teste de anticorpos anti-S serve sobretudo para quantificar os níveis de anticorpos no soro. No entanto, a sua análise pode também ser qualitativa, tendo em conta o ponto de corte estabelecidos pelo fabricante para este teste (>7.1 BAU). Os resultados revelam uma seroprevalência para este anticorpo muito elevada para os dois grupos estudados, 99.5% para os profissionais e 95.9% para utentes de lares (Tabela 3). No grupo dos profissionais de saúde, na primeira colheita (T1), apenas um participante do sexo feminino apresentou teste negativo para anticorpos anti-S e 8 indivíduos do grupo de utentes de lares (1 do sexo feminino e 7 do sexo masculino), apresentaram também teste negativo. No período T2 a reatividade foi de 100% para todos os participantes.

Tabela 3- Análise qualitativa dos anticorpos IgG-anti S nos dois grupos e em diferentes tempos.

		N	Anti S positivo (> 7.1 BAU)		p*
			T1 n (%)	T2 n (%)	
Utentes do Lar	<b>Total</b>	222	213 (95.9)	222 (100)	<0.04
	<b>Feminino</b>	148	147 (94.6)	148 (100)	1.0
	<b>Masculino</b>	74	66 (88.9)	74 (100)	<0.08
Profissionais	<b>Total</b>	231	230 (99.5)	231 (100)	1.0

<b>Feminino</b>	186	185 (99.6)	186 (100)	1.0
<b>Masculino</b>	45	45 (100)	45 (100)	–

Testes considerados positivos de acordo com o ponto de corte estabelecido pelo fabricante (análise qualitativa do teste sorológico). T1:

Período anterior à toma da primeira dose de reforço da vacina. T2: Período anterior à toma da segunda dose de reforço da vacina.

\*Valor-*p* para o teste McNemar, comparação de proporção de Anti-S positivo entre T1 e T2

### 4.3. Análise quantitativa dos anticorpos

O resultado do método utilizado na quantificação de IgGs anti-S é dado em valores de AU, que após a aplicação do fator de correlação 0.142, é transformado em BAU (Unidades de Anticorpos de Ligação). Essa é a unidade de medida, recomendada pela WHO, em ensaios com análise quantitativa para que o resultado possa ser comparado entre diferentes estudos. Na tabela 4 estão apresentados os resultados da análise quantitativa para este anticorpo para os dois grupos, estratificados pelo sexo.

Tabela 4- Determinação quantitativa de IgG anti- S nos dois grupos nas duas colheitas

	N	Anti-S (BAU/mL) T1 Mediana [IQR]	Anti-S (BAU/mL) T2 Mediana [IQR]	<i>p</i> *
<b>Total</b>	222	278.2 [72.4; 1086.5]	4015.7 [1709.9; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Utentes do Lar</b>				
<b>Feminino</b>	148	456.1 [87.8; 1428.8]	4010.2 [2104.5; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Masculino</b>	74	242.4 [57.9; 948.8]	4027.1 [2034.8; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Infeção sim</b>	160	1345.5 [580.3; 2416.1]	4982.6 [2591.8; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Infeção não</b>	62	109.1 [36.9; 1405.8]	1486.7 [403.4; 3692.1]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Profissionais de saúde</b>				
<b>Total</b>	231	104.6 [50.9; 342.1]	455.3 [160.4; 1608.7]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Feminino</b>	186	809.8 [361.9; 2554.1]	4010.2 [1469.9; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Masculino</b>	45	591.2 [305.6; 1765.5]	4027.1 [2034.8; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Infeção sim</b>	23	1498.3 [598.5; 5298.2]	4982.6 [2598.1; 5680.0]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Infeção não</b>	208	89.6 [44.9; 233.4]	1486.7 [403.4; 3692.1]	<b>&lt;0.001</b>

T1: Período anterior à toma da primeira dose de reforço da vacina. T2: Período anterior à toma da segunda dose de reforço da vacina. \*valor-*p* para diferença do nível Anti-S entre T1 e T2 (Wilcoxon-rank test)

Desta forma, a análise da percentagem de variação da mediana foi de 1336.8% para o grupo de utentes de lares e 355.3% para os profissionais de saúde.

A análise emparelhada, pelo teste wilcoxon, mostrou que no período T2, a mediana de anticorpos anti-S dos participantes foi significativamente mais elevados em comparação com o período T1 ( $p < 0.001$ ), tanto no grupo dos utentes de lares (Mediana

[Interquartil, IQR]) 278.2 [72.4; 1086.5] vs. 4015.7 [1709.9; 5680.0], como no grupo de profissionais de saúde 104.6 [50.9; 342.1] vs. 455.3 [160.4; 1608.7] e a mesma tendência foi observada quando a amostra foi estratificada por sexo e pelas categorias “com infecção” e “sem infecção” (infecção inferida a partir do ponto de corte para o teste IgG anti-N nos dois períodos em estudo).

Num mesmo período, tanto em T1 como em T2, não se observaram diferenças significativas entre sexo feminino e masculino, no entanto, foram encontrados valores significativamente mais elevados na categoria “com infecção” (teste de Mann-Whitney,  $p < 0.001$ ; dados não apresentados na tabela 4).

Nas figuras 12 e 13 estão representadas graficamente a análise emparelhada do valor da mediana para os anticorpos IgG anti-S, no grupo dos utentes de lares de idosos e no grupo dos profissionais de saúde, respetivamente.

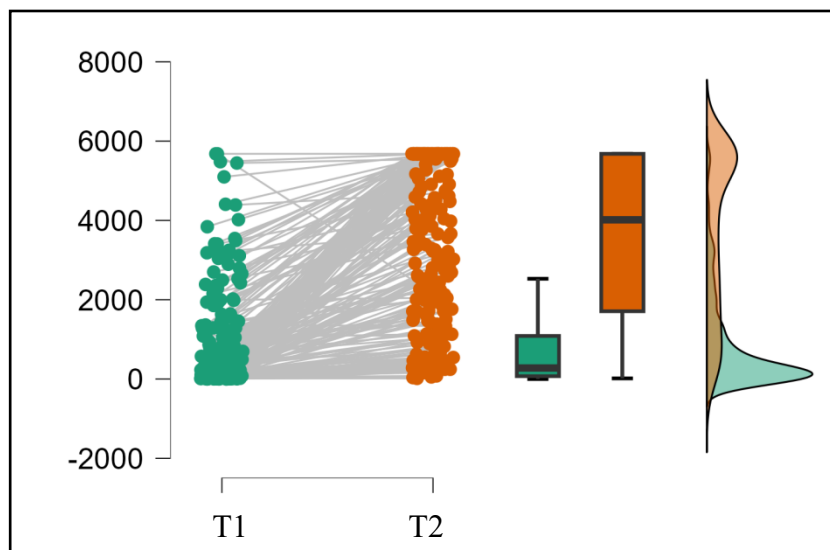


Figura 12- Diferença para a concentração de IgGs Anti-S entre T1 e T2 em utentes de lares de idosos de Bragança

Pode observar-se que para além destes valores serem mais elevados nos utentes de lares de idosos observa-se maior número com evolução negativa, de T1 para T2, no grupo dos profissionais de saúde.

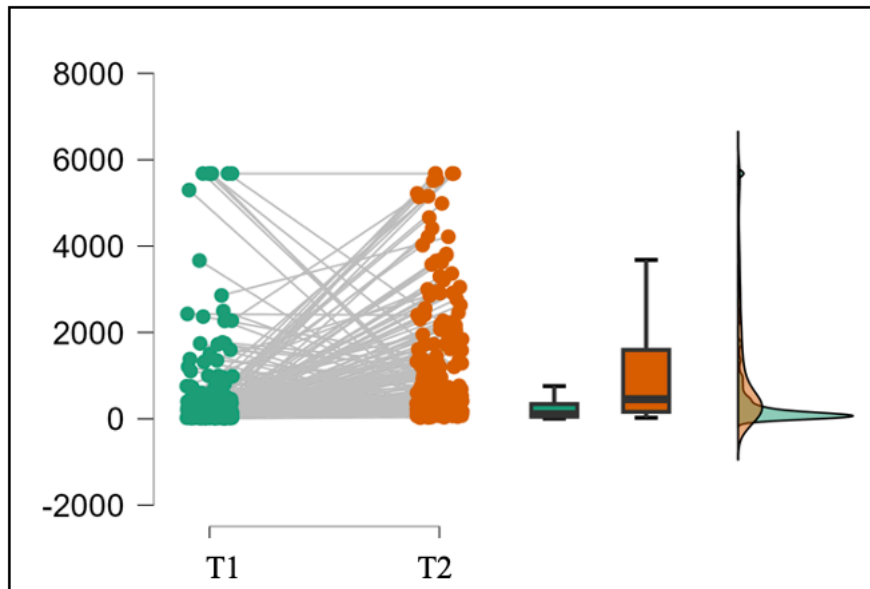


Figura 13- Diferença para a concentração de IgGs Anti-S entre T1 e T2 em profissionais de saúde

## **CAPÍTULO V – DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

Após ter sido decretado o estado de pandemia pela OMS para a doença COVID-19 em março de 2020, os últimos 3 anos, a combinação da imunidade induzida por vacinação e imunidade gerada após infecção natural, levou a que a grande parte da nossa população desenvolve-se pelo menos uma imunidade parcial contra a COVID-19 (DGS, 2022). A pesquisa realizada pelo Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA) para monitorizar a prevalência de anticorpos contra a COVID-19 divulgou os seus resultados mais recentes em agosto de 2022 que apontam para uma seroprevalência de 96% na população de Portugal (INSA, 2022).

O estudo que se apresenta, faz parte de um estudo serológico mais alargado, realizado em colaboração com a ULSNE e inserido numa das atividades do projeto NORDTEST-COVID19. O principal objetivo desta atividade, foi avaliar a resposta à vacina através da análise de anticorpos específicos em profissionais de saúde e utentes em lares de idosos, num período anterior à administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19, como forma de avaliar a proteção gerada pela vacinação e/ou presença de infecção recente. Com esta atividade do projeto, pretendia-se contribuir para que as entidades de saúde pudessem priorizar as vacinas na comunidade.

### *A metodologia utilizada: Anti-S e Anti-N*

Os ensaios utilizados neste estudo tinham como alvo as proteínas N e S do vírus SARS-CoV-2, para avaliar a reatividade dos anticorpos IgG anti-N e IgG anti-S. A proteína S é o principal alvo no desenvolvimento de vacinas, uma vez que, o domínio de ligação ao recetor (Cohen & Burbelo, 2021; Ghaffari et al., 2020), presente na subunidade S1 do vírus, é considerado o principal alvo para anticorpos de ligação e neutralização. Por outro lado, a proteína N é detetada em situações de infecção já que a maioria das vacinas não inclui este alvo (Guiomar et al., 2022c). A ampla utilização de vacinas contra a COVID-19 (por exemplo, Pfizer, AstraZeneca e Moderna), que estimulam apenas a produção de anticorpos anti-S, significa que se pode distinguir os anticorpos provenientes de infeções naturais daqueles derivados da vacinação quando medimos os dois tipos de anticorpos anti-N e anticorpos anti-S (Wadhwa et al., 2021).

Para distinguir entre uma resposta vacinal e uma infecção, muitos estudos optaram por utilizar ambos os ensaios como uma forma de fazer essa diferenciação e inferir sobre a origem dos anticorpos. Seguindo esta metodologia, este estudo apresenta resultados

para os dois tipos de anticorpos anti-N e anti-S. Observou-se elevada seroprevalência para ambos os tipos de anticorpos, quer em T1 quer em T2, revelando não só o efeito protetor da vacina, mas também uma elevada proporção de infetados.

### ***Os estudos serológicos na COVID-19 ao longo da pandemia: o propósito***

Os ensaios sorológicos para anticorpos anti-SARS-CoV-2 foram inicialmente importantes para detetar infeções e analisar o impacto da vacinação e da infeção (quantificação de IgGs), no entanto, não são a principal ferramenta para deteção precoce da infeção. As evidências atuais apoiam para a hipótese de que a proteção inicial fornecida pela vacinação contra o SARS-CoV-2, ou por uma infeção, é inicialmente mediada por anticorpos neutralizantes e as células T (Tang et al., 2020). Neste estudo, essa capacidade de neutralização é inferida a partir da deteção de anticorpos anti-S, que neste teste, em particular, visam o domínio de ligação ao RBD, anticorpos estes com grande capacidade de neutralizar o vírus (Rosadas et al., 2022). Sabe-se que os níveis de anticorpos no soro vão diminuindo ao longo do tempo (Gaebler et al., 2021; Levin et al., 2021; Perry et al., 2022).

Um dos grandes desafios nos estudos de seroprevalência é precisamente o facto de ainda não estar claro quanto tempo os anticorpos permanecem em circulação após a infeção ou vacinação, bem como o nível necessário para gerar essa mesma proteção. (Pooley et al., 2023) Os níveis de anticorpos fornecidos pela vacinação (anti-S) parecem ser reduzidos consideravelmente entre 6 e 8 meses no período pós-vacinação (Gallais et al., 2021; Levin et al., 2021). Estudos iniciais sobre a cinética dos anticorpos mostraram que podem ser detetáveis por um ano, ou mais, após uma infeção (Gallais et al., 2021). Os adquiridos por via natural, a sua capacidade de neutralização é fortemente condicionada pela gravidade da infeção inicial, sugerindo que infeções assintomáticas ou leves podem não proporcionar uma proteção robusta (Pooley et al., 2023).

Durante a pandemia, era esperado que determinar o tempo durante a qual os anticorpos são detetáveis e/ou a sua concentração a que se encontravam no soro dos indivíduos pudesse orientar as entidades de saúde na gestão das doses de reforço necessárias e a distribuição da vacina COVID-19.

Neste estudo em particular, o objetivo é compreender como evoluiu o *status* imunitário dos participantes, analisando os mesmos anticorpos numa abordagem prospetiva, inferindo sobre a proteção alcançada quer pela infeção quer pela vacinação.

Verificou-se que, em geral houve um aumento substancial da quantidade de anti-S entre T1 e T2. No entanto, devemos salientar que em T1 a seroprevalência de anti-S era já muito próxima de 100% em idosos e profissionais de saúde, o que pode ser um fator sugestivo de que o intervalo de tempo entre as duas doses de reforço poderia ser aumentado. Temos dois grupos muito distintos no que diz respeito a resposta imunitária e está devidamente documentado que a resposta imunitária humoral à vacinação é mais fraca em idosos e depende também da presença de certas doenças (Rick et al., 2023). Embora não fosse objetivo deste estudo a comparação entre estes dois grupos, pelos resultados que encontramos é evidente um maior nível de anti-S nos profissionais de saúde, um grupo muito mais jovem que os utentes do lar.

Os participantes de ambos os grupos em estudo foram vacinados com a 1ª dose de reforço (3ª dose). A primeira colheita (T1) foi realizada nos dois grupos entre 10 a 11 meses após o primeiro esquema vacinal e imediatamente anterior à administração da 1ª dose de reforço. A segunda colheita (T2) foi realizada entre 4 a 5 meses após a administração da 1ª dose de reforço, para os profissionais de saúde, e 3 a 4 meses para os utentes de lares de idosos. É necessária acautelar a comparação entre grupos tendo em conta a cinética de “decaimento” destes anticorpos. De qualquer forma interessa analisar a seropositividade dos participantes em T1 e T2 para inferir a proteção alcançada.

#### ***Análise qualitativa da reatividade de anticorpos nos dois períodos em estudo***

De acordo com os resultados obtidos, a proporção de seropositivos para anti-N aumentou significativamente entre T1 e T2. Com base nos dados epidemiológicos nacionais e internacionais, era espectável este resultado. O período da segunda colheita (T2), que antecedeu a 2ª dose de reforço (novembro de 2021), coincidiu com o aumento das infeções atribuídas às variantes VOC delta (B.1.617.2) e ómicron (B.1.1.529) (DGS & INSA, 2022). Estas variantes apresentaram uma taxa de infeção maior em comparação com a primeira (alfa; B.1.1.7) (Twohig et al., 2022). Segundo um estudo recente (Özüdoğru et al., 2023) a taxa mais alta de reinfeção foi observada na variante ómicron numa amostra de 27.487 doentes com COVID-19. Verificou-se que com a variante ómicron a reinfeção foi aproximadamente 30 vezes mais frequente do que na variante alfa e 10 vezes mais frequente do que a variante delta (Özüdoğru et al., 2023). Muitos dos participantes deste estudo, que não tinham sido infetados em T1, foram infetados, muito provavelmente após o aparecimento destas novas variantes, o que resultou num aumento

da prevalência de anticorpos anti-N nos dois grupos em estudo no momento anterior à administração da 2ª dose de reforço. Este aumento de seropositivos anti-N em T2, é mais elevado para o grupo dos profissionais, representando um aumento na ordem dos 207%.

Na análise qualitativa dos anticorpos anti-S, de acordo com o ponto de corte proposto pelo fabricante, também verificamos diferenças na seroprevalência. No período T2, 100% dos participantes apresentaram reatividade a este anticorpo e no período T1 um indivíduo do grupo de profissionais de saúde e 8 participantes do grupo de utentes de lares podem estar relacionado com diferentes fatores. Nestes casos há a possibilidade de a vacina não ter induzido resposta imunitária esperada nestes participantes, ou os anticorpos diminuíram ao ponto de não serem detetados através deste teste. É importante frisar que a medição da primeira colheita (T1) dista cerca de 10 a 11 meses da administração do primeiro esquema vacinal e a segunda colheita em T2, em média, 4 meses. Assim, o decaimento dos anticorpos é inevitavelmente maior em T1. Há ainda a possibilidade de haver indivíduos que estão imunocomprometidos e não fazem a seroconversão (Baka et al., 2021). É precisamente para a gestão da vacinação nestes indivíduos que os testes serológicos se tornam relevantes.

#### *Análise quantitativa de anticorpos nos dois períodos em estudo*

A análise quantitativa de anticorpos IgG anti-S mostrou que no período T2, os níveis anticorpos foram significativamente mais elevados em comparação com o período T1 tanto no grupo dos utentes de lares como no grupo de profissionais de saúde. A mesma tendência foi observada quando a amostra foi estratificada pelo sexo. Como já foi referido anteriormente, com um aumento das infeções (> de número de seropositivos para anti-N), compreende-se que haja também níveis mais elevados de anticorpos IgGs anti-S, uma vez que estes IgGs são produzidos em resposta quer à infeção quer à vacinação. Assim, os valores de anticorpos nas categorias “com infeção”, nos dois grupos de participantes, são significativamente mais elevados. Além disso, o tempo decorrido entre a colheita em T2 e a vacinação com a 3ª dose, foi inferior ao de T1, levando por isso a um menor decaimento. Quando analisamos a magnitude da variação através da percentagem de variação da mediana, ela foi de 1349.4% para o grupo de utentes de lares e 335.3% para os profissionais de saúde. Se verificarmos o grupo de utentes apresentava valores para a mediana mais baixos em T1 e a variação para T2 é muito superior, o que poderá também

dever-se ao facto de terem a inoculação da 3ª dose há menos tempo e terem um maior número de indivíduos com infeção recente.

A inoculação sucessiva com vacinas da COVID-19, ou doses de reforço, é considerada segura e eficaz com base nas evidências disponíveis. (CDC, 2023) Contudo, alguns estudos têm referido potenciais efeitos adversos como miocardite/pericardite (Barda et al., 2021; X. Li et al., 2021; Ryan et al., 2021), complicações neurológicas (García-Grimshaw et al., 2021), trombose (Schultz et al., 2021) e linfadenopatia (Hiller et al., 2021). Estes efeitos adversos podem estar associados a níveis de anticorpos elevados (Bozkurt, 2023).

### ***Limitações do estudo***

A limitação deste estudo prospetivo prende-se sobretudo com a dificuldade em controlar variáveis como o número de infeções após a primeira colheita, dias após essa infeção, sinais e sintomas e também o tipo de vacina administrada na 1ª dose de reforço. A partir do final de 2021, o teste molecular deixou de ser obrigatório, o que dificulta a confirmação de infeções por COVID-19.

Não foi possível programar as colheitas com o mesmo período tempo entre a administração das vacinas até à colheita em T2, para ambos os grupos, uma vez que não foram conhecidas as decisões das entidades de saúde com a antecedência necessária para estabelecer uma determinada data de colheita. Além disso, a programação das doses de reforço, por parte do SNS, alterou a priorização dos grupos de risco estabelecida inicialmente, o que teve implicação no próprio desenho do estudo.

Uma outra limitação do estudo é o facto de não terem sido conduzidos ensaios de neutralização no soro dos participantes. A inclusão de testes de neutralização teria permitido avaliar a capacidade de neutralização no soro dos participantes e comparar ambas as metodologias, o que teria sido útil para inferir sobre a proteção conferida pelos anticorpos. A imunidade celular desempenha um papel essencial na proteção contra a infeção e o desenvolvimento de doença grave (Li et al., 2022). Também não foram realizados testes para avaliar a imunidade celular em relação à COVID-19.

## **CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**

---

## CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Verificou-se nos dois grupos em estudo, que os níveis de anticorpos no soro foram significativamente mais elevados na segunda colheita do que na primeira. A reatividade aos anticorpos anti-S foi de 100% em ambos os grupos o que vem de encontro aos resultados da DGS que apresenta valores muito elevados de seroprevalência para a população portuguesa. Esta discrepância nos dois momentos em estudo, é de certa forma justificada pela prevalência de anticorpos anti-N, que indicam a presença de infeção recente num maior número dos participantes, além do facto de a colheita em T2 ter sido realizada num intervalo de tempo relativamente curto após o período de inoculação da 1ª dose de reforço.

À medida que novas variantes do vírus SARS-CoV-2 surgem, as vacinas podem ser atualizadas para garantir uma eficácia contínua. Doses adicionais, são frequentemente recomendadas para grupos que podem ter uma resposta imunitária mais fraca inicialmente, como os imunodeprimidos e os idosos. No entanto, tal como já foi referido anteriormente, é importante salientar que inoculações sucessivas da vacina COVID-19 podem estar associadas a efeitos adversos. Este facto, por si só justificam a necessidade de realização de estudos serológicos que permitam uma análise epidemiológica dos potenciais efeitos adversos da vacina COVID-19, a fim de se perspetivar o risco benefício de dosagens de reforço em diferentes grupos populacionais.

Neste momento o grupo de trabalho do projeto NORDTEST pretende dar continuidade ao estudo, uma vez que dispõe de uma vasta “seroteca” que permitirá analisar outros parâmetros da imunidade, aplicando mais testes serológicos e moleculares. Será decisivo analisar a real capacidade de neutralização do soro através de testes de neutralização para melhor inferir sobre a proteção alcançada neste nos profissionais de saúde e nos idosos e calibrar os valores quando surgirem novas referências para os níveis protetores de anticorpos.

Ter uma compreensão da dinâmica dos anticorpos ao longo do tempo é vital para avaliar a eficácia das vacinas. Até à data, ainda não foram estabelecidos os níveis exatos de anticorpos que conferem proteção, os estudos neste contexto, desempenha aqui um papel fundamental. Estes dados são de extrema importância para as autoridades de saúde, pois fornecem uma base de conhecimento que pode ser usada para orientar as políticas públicas e a tomada de decisões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott Laboratories. (2022). *Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Instructions for Use*.
- Ahlawat, S., Asha, & Sharma, K. K. (2020). Immunological co-ordination between gut and lungs in SARS-CoV-2 infection. *Virus Research*, 286, 198103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198103>
- Associação Portuguesa de Hospitalização Privada. (2020, April 8). *COMO INFETA A COVID-19?*
- Azevedo-Pereira, J. M. (2020). SARS-CoV-2 e COVID-19: Os Aspectos Viroológicos de uma Pandemia SARS-CoV-2 and COVID-19: Virologic Aspects of a Pandemic. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*. <https://doi.org/10.25756/rpf.v12i1-2.237>
- Baka, M., Michos, A., Alexopoulou, A., Bouka, P., Bouka, E., Dana, E., Dimitriou, G., Doganis, Grivea, I., Ioannidou, M., Kourti, M., Magkou, E., Makis, A., Malama, A., Mantadakis, E., Markozannes, G., Mitsios, A., Moschovi, M., Papadakis, V., ... Petridou, E. T. (2021). COVID-19 among children with cancer in Greece (2020): Results from the Nationwide Registry of Childhood Hematological Malignancies and Solid Tumors (NARECHEM-ST). In *Pediatric Blood and Cancer* (Vol. 68, Issue 8). <https://doi.org/10.1002/pbc.29079>
- Barda, N., Dagan, N., Ben-Shlomo, Y., Kepten, E., Waxman, J., Ohana, R., Hernán, M. A., Lipsitch, M., Kohane, I., Netzer, D., Reis, B. Y., & Balicer, R. D. (2021). Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *New England Journal of Medicine*, 385(12). <https://doi.org/10.1056/nejmoa2110475>
- Boan, P., Jardine, A., & Pryce, T. M. (2022). Clinical associations of SARS-CoV-2 viral load using the first WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA. *Pathology*, 54(3). <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.11.006>
- Bonanni, P., Cantón, R., Gill, D., Halfon, P., Liebert, U. G., Crespo, K. A. N., Martín, J. J. P., & Trombetta, C. M. (2021). The Role of Serology Testing to Strengthen Vaccination Initiatives and Policies for COVID-19 in Europe. *COVID*, 1(1). <https://doi.org/10.3390/covid1010004>

- Bozkurt, B. (2023). Shedding Light on Mechanisms of Myocarditis with COVID-19 mRNA Vaccines. In *Circulation* (Vol. 147, Issue 11). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.063396>
- Bryan, A., Pepper, G., Wener, M. H., Fink, S. L., Morishima, C., Chaudhary, A., Jerome, K. R., Mathias, P. C., & Greninger, A. L. (2020). Performance characteristics of the abbott architect sars-cov-2 igg assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.00941-20>
- Butt, A. A., Dargham, S. R., Tang, P., Chemaitelly, H., Hasan, M. R., Coyle, P. V., Kaleeckal, A. H., Latif, A. N., Loka, S., Shaik, R. M., Zaqout, A., Almaslamani, M. A., Al Khal, A., Bertollini, R., Abou-Samra, A. B., & Abu-Raddad, L. J. (2022). COVID-19 disease severity in persons infected with the Omicron variant compared with the Delta variant in Qatar. *Journal of Global Health*, 12. <https://doi.org/10.7189/jogh.12.05032>
- Câmara, B. (2021, June 8). *É assim que Anticorpos Neutralizantes são detectados*. <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2021/06/e-assim-que-anticorpos-neutralizantes.html>
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). *StatPearls*.
- CDC. (2021). Symptoms of COVID-19 | CDC. In *Centre for Disease Prevention and Control (CDC)*.
- CDC. (2023, November 3). *Safety of COVID-19 Vaccines*.
- Ceia, F., Nunes Silva, C., & Tavares, M. (2021). *Imunidade na infecção pelo SARS-CoV-2: o que sabemos SARS-CoV-2 immune response: an overview*.
- Cheng, M. P., Papenburg, J., Desjardins, M., Kanjilal, S., Quach, C., Libman, M., Dittrich, S., & Yansouni, C. P. (2020). Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome–related coronavirus 2: A narrative review. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 172, Issue 11, pp. 726–734). American College of Physicians. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Cohen, J. I., & Burbelo, P. D. (2021). Reinfection With SARS-CoV-2: Implications for Vaccines. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious*

*Diseases Society of America*, 73(11), e4223–e4228.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1866>

Comissão Europeia. (2022a). *Vacinas seguras contra a COVID-19 para os europeus* | Comissão Europeia. Comissão Europeia. [https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans\\_pt#informaes-sobre-a-vacinao-na-ue](https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_pt#informaes-sobre-a-vacinao-na-ue)

Comissão Europeia. (2022b). *Vacinas seguras contra a COVID-19 para os europeus* | Comissão Europeia. Comissão Europeia. [https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans\\_pt#informaes-sobre-a-vacinao-na-ue](https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_pt#informaes-sobre-a-vacinao-na-ue)

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Van Der Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Cristiano, A., Pieri, M., Sarubbi, S., Pelagalli, M., Calugi, G., Tomassetti, F., Bernardini, S., & Nuccetelli, M. (2022). Evaluation of serological anti-SARS-CoV-2 chemiluminescent immunoassays correlated to live virus neutralization test, for the detection of anti-RBD antibodies as a relevant alternative in COVID-19 large-scale neutralizing activity monitoring. *Clinical Immunology*, 234, 108918. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2021.108918>

Cristóvão, J., Vieira, M., Conceição, C., Lopes, D., Pingarilho, M., Ferreira, P., & Parreira, R. (2020, July 26). *Imunidade na COVID-19: muitas perguntas e algumas respostas*.

David, D., MS, M., Galli, C., & PhD, M. (2021). Antibody testing for SARS-CoV-2 infection, quantitative determination, response to vaccines and viral variability. In *Abbott Laboratories*. <https://cdn.pepperapps.io/diagnostics-cms/public/>

de Oliveira, M. A. L., Watanabe, A. S. A., Cesar, D. E., Candido, J. M. B., Lima, N. M., Moreira, O. B. O., & Chellini, P. R. (2022). DIAGNOSTIC TESTS FOR SARS-

COV-2: A CRITICAL REFLECTION. *Quimica Nova*, 45(6), 760–766.  
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170895>

Deeks, J. J., Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Spijker, R., Taylor-Phillips, S., Adriano, A., Beese, S., Dretzke, J., Ferrante di Ruffano, L., Harris, I. M., Price, M. J., Dittrich, S., Emperador, D., Hooft, L., Leeftang, M. M. G., & Van den Bruel, A. (2020). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2020, Issue 6).  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>

Del Turco, S., Vianello, A., Ragusa, R., Caselli, C., & Basta, G. (2020). COVID-19 and cardiovascular consequences: Is the endothelial dysfunction the hardest challenge? In *Thrombosis Research* (Vol. 196). <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.08.039>

DGS. (2023). *Estado Epidemiológico COVID19 Portugal*.  
<https://covid19estamoson.gov.pt/estado-epidemiologico-covid19-portugal/>

DGS, & INSA. (2022). *Relatório de Monitorização da Situação Epidemiológica da COVID-19 Monitoring of COVID-19*.

Direção Geral de Saúde. (2020). *COVID-19 Relatório nº24 da situação epidemiológica em Portugal 26-03-2020*. Direção Geral de Saúde. <https://www.dgs.pt/em-destaque/relatorio-de-situacao-n-024-26032020-pdf.aspx>

English, E., E., L., Cook, Isabelle, Piec, Samir, Dervisevic, D., W., Fraser, Garry, W., & John. (2021). Performance of the Abbott SARS-CoV-2 IgG II Quantitative Antibody Assay Including the New Variants of Concern, VOC 202012/V1 (United Kingdom) and VOC 202012/V2 (South Africa), and First Steps towards Global Harmonization of COVID-19 Antibody Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(9).  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00288-21>

Farmácia Portugal. (2023). *COVID-19: Quais os tipos de testes que existem?* .  
<https://farmaciaportugal.pt/covid-19-quais-os-tipos-de-testes-que-existem/>

Flávia Martinello. (2021). Diagnostic accuracy of serological methods for detecting COVID-19. *Brazilian Journal of Clinical Analyses*.

Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C.,

- Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, *591*(7851). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
- Gallais, F., Gantner, P., Bruel, T., Velay, A., Planas, D., Wendling, M.-J., Bayer, S., Solis, M., Laugel, E., Reix, N., Schneider, A., Glady, L., Panaget, B., Collongues, N., Partisani, M., Lessinger, J.-M., Fontanet, A., Rey, D., Hansmann, Y., ... Fafi-Kremer, S. (2021). Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*, *71*, 103561. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103561>
- Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., St. Denis, K., Nitido, A. D., Garcia, Z. H., Hauser, B. M., Feldman, J., Pavlovic, M. N., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Sigal, A., Schmidt, A. G., Iafrate, A. J., Naranbhai, V., & Balazs, A. B. (2021). Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, *184*(9), 2372-2383.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.013>
- García-Grimshaw, M., Ceballos-Liceaga, S. E., Hernández-Vanegas, L. E., Núñez, I., Hernández-Valdivia, N., Carrillo-García, D. A., Michel-Chávez, A., Galnares-Olalde, J. A., Carbajal-Sandoval, G., del Mar Saniger-Alba, M., Carrillo-Mezo, R. A., Fragosó-Saavedra, S., Espino-Ojeda, A., Blaisdell-Vidal, C., Mosqueda-Gómez, J. L., Sierra-Madero, J., Pérez-Padilla, R., Alomía-Zegarra, J. L., López-Gatell, H., ... Valdés-Ferrer, S. I. (2021). Neurologic adverse events among 704,003 first-dose recipients of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in Mexico: A nationwide descriptive study. *Clinical Immunology*, *229*. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108786>
- Ghaffari, A., Meurant, R., & Ardakani, A. (2020). COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform? *Diagnostics*, *10*(7), 453. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10070453>
- Guiomar, R., Santos, A. J., Melo, A. M., Costa, I., Matos, R., Rodrigues, A. P., Kislaya, I., Silva, A. S., Roque, C., Nunes, C., Aguiar, J., Graça, F., Silva Graça, A., & Machado, A. (2022a). Monitoring of SARS-CoV-2 Specific Antibodies after Vaccination. *Vaccines*, *10*(2), 154. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020154>

- Guiomar, R., Santos, A. J., Melo, A. M., Costa, I., Matos, R., Rodrigues, A. P., Kislaya, I., Silva, A. S., Roque, C., Nunes, C., Aguiar, J., Graça, F., Silva Graça, A., & Machado, A. (2022b). Monitoring of SARS-CoV-2 Specific Antibodies after Vaccination. *Vaccines*, *10*(2), 154. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020154>
- Guiomar, R., Santos, A. J., Melo, A. M., Costa, I., Matos, R., Rodrigues, A. P., Kislaya, I., Silva, A. S., Roque, C., Nunes, C., Aguiar, J., Graça, F., Silva Graça, A., & Machado, A. (2022c). Monitoring of SARS-CoV-2 Specific Antibodies after Vaccination. *Vaccines*, *10*(2), 154. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020154>
- Habibzadeh, P., Mofatteh, M., Silawi, M., Ghavami, S., & Faghihi, M. A. (2021). Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 58, Issue 6). <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1884640>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. In *Trends in Immunology* (Vol. 41, Issue 12, pp. 1100–1115). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- Harrithøj, L. H., Gybel-Brask, M., Afzal, S., Kamstrup, P. R., Jørgensen, C. S., Thomsen, M. K., Hilsted, L., Friis-Hansen, L., Szecsi, P. B., Pedersen, L., Nielsen, L., Hansen, C. B., Garred, P., Korsholm, T. L., Mikkelsen, S., Nielsen, K. O., Møller, B. K., Hansen, A. T., Iversen, K. K., ... Dessau, R. B. (2021). Comparison of 16 serological SARS-CoV-2 immunoassays in 16 clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, *59*(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.02596-20>
- Hart, W. S., Miller, E., Andrews, N. J., Waight, P., Maini, P. K., Funk, S., & Thompson, R. N. (2021). Generation time of the Alpha and Delta SARS-CoV-2 variants. *MedRxiv*.
- HASÖKSÜZ, M., KILIÇ, S., & SARAÇ, F. (2020a). Coronaviruses and SARS-COV-2. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, *50*(SI-1), 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
- HASÖKSÜZ, M., KILIÇ, S., & SARAÇ, F. (2020b). Coronaviruses and SARS-COV-2. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, *50*(SI-1), 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>

- Hiller, N., Goldberg, S. N., Cohen-Cyberknoh, M., Vainstein, V., & Simanovsky, N. (2021). Lymphadenopathy Associated With the COVID-19 Vaccine. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.13524>
- Hoffman, T., Nissen, K., Krambrich, J., Rönnerberg, B., Akaberi, D., Esmaeilzadeh, M., Salaneck, E., Lindahl, J., & Lundkvist, Å. (2020). Evaluation of a COVID-19 IgM and IgG rapid test; an efficient tool for assessment of past exposure to SARS-CoV-2. *Infection Ecology and Epidemiology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1080/20008686.2020.1754538>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020a). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020b). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hsu, L., Hurraß, J., Kossow, A., Klobucnik, J., Nießen, J., Wiesmüller, G. A., Grüne, B., & Joisten, C. (2022). Breakthrough infections with the SARS-CoV-2 Delta variant: vaccinations halved transmission risk. *Public Health*, *204*. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2022.01.005>
- Hussain, A., Rafeeq, H., Asif, H. M., Shabbir, S., Bilal, M., Mulla, S. I., Franco, M., & Iqbal, H. M. N. (2021). Current scenario of COVID-19 vaccinations and immune response along with antibody titer in vaccinated inhabitants of different countries. In *International Immunopharmacology* (Vol. 99). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108050>
- Infantino, M., Grossi, V., Lari, B., Bambi, R., Perri, A., Manneschi, M., Terenzi, G., Liotti, I., Ciotta, G., Taddei, C., Benucci, M., Casprini, P., Veneziani, F., Fabbri, S., Pompetti, A., & Manfredi, M. (2020). Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: an

- Italian experience. *Journal of Medical Virology*, 92(9).  
<https://doi.org/10.1002/jmv.25932>
- Infarmed. (2021). *Vacinas aprovadas- COVID-19 (Quadro Resumo)*. Infarmed.  
<https://www.infarmed.pt/web/infarmed/vacinas-aprovadas>
- Islam, M. R., & Hossain, M. J. (2022). Detection of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant has created panic among the people across the world: What should we do right now? In *Journal of Medical Virology* (Vol. 94, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1002/jmv.27546>
- JASP (Version 0.17)*. (2023). <https://jasp-stats.org/>
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*, 141.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>
- Khan, M., Shah, S. H., Salman, M., Abdullah, M., Hayat, F., & Akbar, S. (2023). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A General Overview. *Global Journal of Medical, Pharmaceutical, and Biomedical Update*, 18. [https://doi.org/10.25259/gjmbpu\\_77\\_2022](https://doi.org/10.25259/gjmbpu_77_2022)
- Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921.e10.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kristiansen, P. A., Page, M., Bernasconi, V., Mattiuzzo, G., Dull, P., Makar, K., Plotkin, S., & Knezevic, I. (2021). WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10282).  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00527-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00527-4)
- Levesque, J., & Maybury, D. W. (2020). A note on COVID-19 seroprevalence studies: a meta-analysis using hierarchical modelling. *MedRxiv*.
- Levin, E. G., Lustig, Y., Cohen, C., Fluss, R., Indenbaum, V., Amit, S., Doolman, R., Asraf, K., Mendelson, E., Ziv, A., Rubin, C., Freedman, L., Kreiss, Y., & Regev-Yochay, G. (2021). Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *New England Journal of Medicine*, 385(24), e84.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114583>

- Li, Q., Wang, Y., Sun, Q., Knopf, J., Herrmann, M., Lin, L., Jiang, J., Shao, C., Li, P., He, X., Hua, F., Niu, Z., Ma, C., Zhu, Y., Ippolito, G., Piacentini, M., Estaquier, J., Melino, S., Weiss, F. D., ... Shi, Y. (2022). Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death & Differentiation*, 29(6), 1107–1122. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01015-x>
- Li, X., Ostropelets, A., Makadia, R., Shaoibi, A., Rao, G., & ... (2021). Characterizing the incidence of adverse events of special interest for COVID-19 vaccines across eight countries: a multinational network cohort study. *MedRxiv*.
- Liu, K. T., Han, Y. J., Wu, G. H., Huang, K. Y. A., & Huang, P. N. (2022). Overview of Neutralization Assays and International Standard for Detecting SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14071560>
- Liu, L., Iketani, S., Guo, Y., Chan, J. F. W., Wang, M., Liu, L., Luo, Y., Chu, H., Huang, Y., Nair, M. S., Yu, J., Chik, K. K. H., Yuen, T. T. T., Yoon, C., To, K. K. W., Chen, H., Yin, M. T., Sobieszczyk, M. E., Huang, Y., ... Ho, D. D. (2022). Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 602(7898), 676–681. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04388-0>
- Long, Q. X., Tang, X. J., Shi, Q. L., Li, Q., Deng, H. J., Yuan, J., Hu, J. L., Xu, W., Zhang, Y., Lv, F. J., Su, K., Zhang, F., Gong, J., Wu, B., Liu, X. M., Li, J. J., Qiu, J. F., Chen, J., & Huang, A. L. (2020). Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine*, 26(8). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- Lopes, M. (2021). *APPROACHES TO CONTROL THE COVID-19 PANDEMIC*.
- Lumley, S. F., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Warren, F., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Warren, L., Axten, D., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Screaton, G., ... Eyre, D. W. (2021). Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine*, 384(6), 533–540. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034545>
- Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Meigs, D. D., Hasan, M., Patel, M., Kline, P., Chang, R. C.-C.,

- Chang, L., Gendelman, H. E., & Kevadiya, B. D. (2020a). The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 15(3), 359–386. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>
- Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Meigs, D. D., Hasan, M., Patel, M., Kline, P., Chang, R. C.-C., Chang, L., Gendelman, H. E., & Kevadiya, B. D. (2020b). The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), 1. <https://doi.org/10.1007/S11481-020-09944-5>
- Meyer, B., Reimerink, J., Torriani, G., Brouwer, F., Godeke, G. J., Yerly, S., Hoogerwerf, M., Vuilleumier, N., Kaiser, L., Eckerle, I., & Reusken, C. (2020). Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging Microbes and Infections*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
- Michelon, C. M. (2021). Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 53(2). <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202100961>
- Moghadas, S. M., Vilches, T. N., Zhang, K., Wells, C. R., Shoukat, A., Singer, B. H., Meyers, L. A., Neuzil, K. M., Langley, J. M., Fitzpatrick, M. C., & Galvani, A. P. (2021). The impact of vaccination on COVID-19 outbreaks in the United States. *MedRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*, 2020.11.27.20240051. <https://doi.org/10.1101/2020.11.27.20240051>
- Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Recent progress in research and development. In *Journal of Infection and Chemotherapy* (Vol. 19, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., & Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>

- Ochani, R. K., Kumar Ochani, R., Asad, A., Yasmin, F., Shaikh, S., Khalid, H., Batra, S., Rizwan Sohail, M., Mahmood, S. F., Ochani, R., Arshad, M. H., Kumar, A., Surani, S., Civil, R. K. M. P., Karachi, H., & Karachi, P. ; (2021). COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. In *Le Infezioni in Medicina, n* (Vol. 20).
- Oliveira, M., Watanabe, A., Cesar, D., Candido, J., Lima, N., Moreira, O., & Chellini, P. (2022). TESTES DIAGNÓSTICOS PARA O SARS-COV-2: UMA REFLEXÃO CRÍTICA. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170895>
- OMS. (2020). *OMS afirma que COVID-19 é agora caracterizada como pandemia*. <https://www.paho.org/pt/news/11-3-2020-who-characterizes-covid-19-pandemic>
- OPAS. (2021). *Avaliação de efetividade das vacinas contra a COVID-19*.
- OPAS/OMS Brasil. (2020). *OMS afirma que COVID-19 é agora caracterizada como pandemia*. Banco de Notícias.
- Özüdoğru, O., Bahçe, Y. G., & Acer, Ö. (2023). SARS CoV-2 reinfection rate is higher in the Omicron variant than in the Alpha and Delta variants. *Irish Journal of Medical Science, 192*(2). <https://doi.org/10.1007/s11845-022-03060-4>
- Papanikolaou, V., Chrysovergis, A., Ragos, V., Tsiambas, E., Katsinis, S., Manoli, A., Papouliakos, S., Roukas, D., Mastronikolis, S., Peschos, D., Batistatou, A., Kyrodimos, E., & Mastronikolis, N. (2022). From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. *Gene, 814*, 146134. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146134>
- Perry, J., Osman, S., Wright, J., Richard-Greenblatt, M., Buchan, S. A., Sadarangani, M., & Bolotin, S. (2022). Does a humoral correlate of protection exist for SARS-CoV-2? A systematic review. *PLoS ONE, 17*(4 April). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266852>
- Pooley, N., Abdool Karim, S. S., Combadière, B., Ooi, E. E., Harris, R. C., El Guerche Seblain, C., Kisomi, M., & Shaikh, N. (2023). Durability of Vaccine-Induced and Natural Immunity Against COVID-19: A Narrative Review. In *Infectious Diseases and Therapy* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00753-2>

- Presidência da República. (2020). Decreto do Presidente da República 14-A/2020 de 18 de março. *Diário Da República n.º 55/2020, 3º Suplemento, Série I, 2, 13-(2)-13-(4)*.
- Presidência de Republica. (2020a). Vacinação de grupos prioritários deve começar a 27 de dezembro - XXII Governo - República Portuguesa. *Diário Da República*.
- Presidência de Republica. (2020b). *Legislação COVID-19*. Diário Da República. <https://dre.pt/dre/geral/legislacao-covid-19>
- Ren, L. L., Wang, Y. M., Wu, Z. Q., Xiang, Z. C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y. Z., Xiong, Y., Li, Y. J., Li, X. W., Li, H., Fan, G. H., Gu, X. Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J. Y., Yang, F., Wang, X. M., Wu, C., ... Wang, J. W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese Medical Journal, 133*(9). <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>
- Rick, A. M., Laurens, M. B., Huang, Y., Yu, C., Martin, T. C. S., Rodriguez, C. A., Rostad, C. A., Maboja, R. M., Baden, L. R., El Sahly, H. M., Grinsztejn, B., Gray, G. E., Gay, C. L., Gilbert, P. B., Janes, H. E., Kublin, J. G., Huang, Y., Leav, B., Hirsch, I., ... Sobieszczyk, M. E. (2023). Risk of COVID-19 after natural infection or vaccination. *EBioMedicine, 96*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104799>
- Rosadas, C., Khan, M., Parker, E., Marchesin, F., Katsanovskaja, K., Sureda-Vives, M., Fernandez, N., Randell, P., Harvey, R., Lilley, A., Harris, B. H. L., Zuhair, M., Fertleman, M., Ijaz, S., Dicks, S., Short, C. E., Quinlan, R., Taylor, G. P., Hu, K., ... Tedder, R. S. (2022). Detection and quantification of antibody to SARS CoV 2 receptor binding domain provides enhanced sensitivity, specificity and utility. *Journal of Virological Methods, 302*. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114475>
- RTP. (2020, March 31). *Coronavírus. O que é e como começou?*
- Ryan, M., Montgomery, J., Engler, R., Hoffman, D., McClenathan, B., Collins, L., Loran, D., Hrcir, D., Herring, K., Platzer, M., Adams, N., Sanou, A., & Cooper, L. T. (2021). Myocarditis following immunization with mrna covid-19 vaccines in members of the us military. *JAMA Cardiology, 6*(10). <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.2833>

- Salehi, S., Reddy, S., & Gholamrezanezhad, A. (2020). Long-term Pulmonary Consequences of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): What We Know and What to Expect. In *Journal of Thoracic Imaging* (Vol. 35, Issue 4). <https://doi.org/10.1097/RTI.0000000000000534>
- Samanovic, M. I., Cornelius, A. R., Gray-Gaillard, S. L., Allen, J. R., Karmacharya, T., Wilson, J. P., Hyman, S. W., Tuen, M., Koralov, S. B., Mulligan, M. J., & Herati, R. S. (2021). Robust immune responses after one dose of BNT162b2 mRNA vaccine dose in SARS-CoV-2 experienced individuals. *MedRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.07.21251311>
- Schultz, N. H., Sørvoll, I. H., Michelsen, A. E., Munthe, L. A., Lund-Johansen, F., Ahlen, M. T., Wiedmann, M., Aamodt, A.-H., Skattør, T. H., Tjønnfjord, G. E., & Holme, P. A. (2021). Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 384(22). <https://doi.org/10.1056/nejmoa2104882>
- Serviço Nacional de Saúde. (2021). *Covid-19 | Terceira dose da vacina – SNS*. Serviço Nacional de Saúde. <https://www.sns.gov.pt/noticias/2021/10/08/covid-19-terceira-dose-da-vacina/>
- Serviço Nacional de Saúde. (2022a). *Vacina COVID-19 | SNS24. Serviço Nacional de Saúde*.
- Serviço Nacional de Saúde. (2022b). *Certificado de vacinação*. Serviço Nacional de Saúde. <https://www.sns24.gov.pt/guia/certificado-digital-covid-da-ue/certificado-de-vacinacao/>
- Shaw, B., Daskareh, M., & Gholamrezanezhad, A. (2021). The lingering manifestations of COVID-19 during and after convalescence: update on long-term pulmonary consequences of coronavirus disease 2019 (COVID-19). In *Radiologia Medica* (Vol. 126, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s11547-020-01295-8>
- Silva de Sordi, L. H., Sales Oliveira Magalhães, I., Abreu Casselhas, D., & Chaves Andrade, M. (2020). O Papel da Imunidade Inata na COVID-19. *REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE*, 10(3). <https://doi.org/10.21876/rchsci.v10i3.997>
- Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I. C., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C. W., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y. J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., &

- Wang, L. F. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology*, 38(9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
- Tang, M. S., Case, J. B., Franks, C. E., Chen, R. E., Anderson, N. W., Henderson, J. P., Diamond, M. S., Gronowski, A. M., & Farnsworth, C. W. (2020). Association between SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies and Commercial Serological Assays. *Clinical Chemistry*, 66(12), 1538–1547. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa211>
- Taylor, S. C., Hurst, B., Charlton, C. L., Bailey, A., Kanji, J. N., McCarthy, M. K., Morrison, T. E., Huey, L., Annen, K., Dombourian, M. G., & Knighth, V. (2021). A New SARS-CoV-2 Dual-Purpose Serology Test: Highly Accurate Infection Tracing and Neutralizing Antibody Response Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.02438-20>
- Twohig, K. A., Nyberg, T., Zaidi, A., Thelwall, S., Sinnathamby, M. A., Aliabadi, S., Seaman, S. R., Harris, R. J., Hope, R., Lopez-Bernal, J., Gallagher, E., Charlett, A., De Angelis, D., Presanis, A. M., Dabrera, G., Koshy, C., Ash, A., Wise, E., Moore, N., ... Gunson, R. (2022). Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(1). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00475-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00475-8)
- Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y. C., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. C. W. (2020). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. In *ACS nano* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
- Uhteg, K., Jarrett, J., Richards, M., Howard, C., Morehead, E., Geahr, M., Gluck, L., Hanlon, A., Ellis, B., Kaur, H., Simner, P., Carroll, K. C., & Mostafa, H. H. (2020). Comparing the analytical performance of three SARS-CoV-2 molecular diagnostic assays. *Journal of Clinical Virology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104384>
- Vardoulakis, S., Sheel, M., Lal, A., & Gray, D. (2020). COVID-19 environmental transmission and preventive public health measures. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 44(5), 333–335. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.13033>

- Wadhwa, A., Yin, S., Freeman, B., Hershov, R. B., Killerby, M., Yousaf, A. R., Lester, S., Mills, L., Buono, S. A., Pomeroy, M., Owusu, D., Chu, V. T., Tate, J. E., Bhattacharyya, S., Hall, P., Thornburg, N. J., & Kirking, H. L. (2021). Comparison of the SARS-CoV-2 spike protein ELISA and the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG nucleocapsid protein assays for detection of antibodies. *PloS One*, *16*(7), e0255208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255208>
- World Health Organization. (2020a). Coronavirus disease 2019- Situation Report – 71. In *World Health Organization* (Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00112-021-01158-0>
- World Health Organization. (2020b). Coronavirus disease 2019- Situation Report – 71. In *World Health Organization* (Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00112-021-01158-0>
- World Health Organization. (2020c). R&D Blueprint and COVID-19. *World Health Organization*. <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>
- World Health Organization. (2021). *Orientação para vigilância de variantes do SARS-CoV-2*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56210>
- World Health Organization. (2022). *Tracking SARS-CoV-2 variants*. World Health Organization. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- World Health Organization. (2023a). *OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2*.
- World Health Organization. (2023b). *Os efeitos das variantes do vírus nas vacinas COVID-19*. <https://www.who.int/pt/news-room/feature-stories/detail/the-effects-of-virus-variants-on-covid-19-vaccines>
- Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., Sun, C., & Zhang, S. (2023). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. In *Virology Journal* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>
- Zhu, F., Althaus, T., Tan, C. W., Costantini, A., Chia, W. N., Van Vinh Chau, N., Van Tan, L., Mattiuzzo, G., Rose, N. J., Voiglio, E., & Wang, L. F. (2022). WHO

international standard for SARS-CoV-2 antibodies to determine markers of protection. In *The Lancet Microbe* (Vol. 3, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00307-4)

# ANEXOS

## ANEXO I- Parecer da Comissão de Ética



IdeN.º 34/2021

### Parecer da Comissão de Ética

#### Identificação do estudo:

Reunião CA 30.9.2021  
Quadrupla, desde que não  
tenha custos financeiros  
nem a ULSNE!

Dr. Carlos Alberto Vaz  
Presidente do  
Conselho de Administração

COVID – 19: Imunidade Pós – Vacinação – Estudo Serológico na População do Nordeste de Portugal

#### Parecer da Comissão de Ética:

Em reunião de 09/09/2021, foi analisado o presente trabalho, tendo a CE considerado que deverá ser salvaguardado o consentimento informado nos casos em que o destinatário não reúna requisitos legais para o poder prestar (em função da idade, estado de consciência ou em situação de inabilitado).

Observada esta condição o estudo tem interesse científico para a comunidade e para a ULSNE e não tem qualquer custo direto ou indireto para a ULSNE.

A Presidente da Comissão de Ética da ULSNE, E.P.E.

Despacho do P.C.A.:

## ANEXO II- Formulário de Consentimento



SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE



### INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

#### COVID-19: IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO ESTUDO SEROLÓGICO NA POPULAÇÃO DE BRAGANÇA

O estudo para o qual pedimos a sua participação, tem como principal objetivo a quantificação de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 permitindo avaliar o “status” imunitário em indivíduos vacinados. Para tal, será realizado um imunoensaio quimioluminescente (SARS-CoV-2 IgG II de micropartículas - CMIA). Para a determinação quantitativa de anticorpos IgG (Spike) para SARS-CoV-2, será retirada uma amostra de sangue aos indivíduos recrutados para o estudo. Será aplicado um questionário sobre hábitos de vida e condições de saúde, incluindo se testou positivo para o SARS-CoV-2 antes da vacina ou mesmo depois da imunização.

#### CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE

Confirmando que expliquei ao participante/representante legal, de forma adequada e compreensível, a investigação referida, os benefícios, os riscos e possíveis complicações associadas à sua realização.

Investigador responsável

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(assinatura)

Identificação do participante:

Nome \_\_\_\_\_ BI/CC n.º \_\_\_\_\_

#### PARTICIPANTE/REPRESENTANTE LEGAL

- Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar. Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão. Concordo em participar, respondendo às questões propostas e permitindo a recolha de amostras de sangue que serão utilizadas apenas para realizar as análises que me foram indicadas. Aceito ainda que sejam guardadas amostras que venham a ser utilizadas posteriormente, para isso serei contactado ou quem me representar legalmente. Concordo em colaborar no estudo,

O participante:

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(assinatura)

Nome (Representante legal): \_\_\_\_\_

BI/CC n.º \_\_\_\_\_ Grau de parentesco \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(assinatura)

*Em atenção à “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial e à Convenção sobre os Direitos do Homem e a Biomedicina do Conselho da Europa.*