



# **Avaliação da Imunidade Humoral anti-SARS-CoV-2 em Profissionais de Saúde da ULSNE antes da primeira dose de reforço da vacina COVID-19**

**Tifany Aline Pereira**

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, outubro 2022

Trabalho financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e por fundos nacionais - Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico (IC&DT: Programa Testar com Ciência e Solidariedade), no âmbito do projeto “NORDTEST – Infecção por coronavírus SARS-CoV-2 no Nordeste de Portugal: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença (NORTE-01-0145-FEDER-072562)”. Este trabalho foi efetuado em colaboração Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança (ULSNE) bem como, com o Centro de Investigação de Montanha (CIMO).



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



**FCT**

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Centro de  
Investigação  
de Montanha



## **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:

### **Artigos em Revista de Conferencia (aceite para publicação):**

M. Caldeira; C. Rodrigues; T. Pereira; A. Rodrigues; V. Gonçalves; M. Montanha. Detection of anti-SARS-COV-2 IgG antibodies in elderly in the period before the first vaccination boost. 9th CIS - International Congress on Health, realizado em U. Minho, Braga Portugal de 27 a 30 de setembro de 2022.

### **Comunicações em Congressos:**

T. Pereira, M. Caldeira, A. Rodrigues, M. Alves, V. Gonçalves, S. Pinto, M. Montanha, C. Teixeira, C. Rodrigues. Antibody response among Portuguese healthcare workers prior to SARS-CoV-2 vaccine booster administration. Comunicação (1063) apresentada no XL Reunión Anual de la Sociedad Española de Epidemiología (SEE) e XVII Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia (APE), realizado em Donostia-San Sebastián, Espanha de 30 de agosto a 2 de setembro de 2022.

M. Caldeira; C. Rodrigues; T. Pereira; A. Rodrigues; V. Gonçalves; M. Montanha. Detection of anti-SARS-COV-2 IgG antibodies in elderly in the period before the first vaccination boost. Comunicação (2022-20250) apresentada no 9th CIS - International Congress on Health, realizado em U. Minho, Braga Portugal de 27 a 30 de setembro de 2022.

### **Resumos em livros de conferência indexados ao ISI:**

T. Pereira, M. Caldeira, A. Rodrigues, M. Alves, V. Gonçalves, S. Pinto, M. Montanha, C. Teixeira, C. Rodrigues. Gaceta Sanitaria Vol. 36. Núm. SC. Pag 157-376 XL Reunión Anual de la Sociedad Española de Epidemiología (SEE) y XVII Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia (APE), Comunicação: 1063. Antibody response among Portuguese healthcare workers prior to SARS-CoV-2 vaccine booster administration.

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa jornada, com inúmeros desafios pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada.

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Carina de Fátima Rodrigues, o ter-me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço a orientação pautada por um elevado e rigoroso nível científico, pelo seu interesse permanente e pela a sua visão crítica e oportuna, os quais contribuíram para enriquecer todas as etapas subjacentes deste trabalho. Agradeço também pela contratante disponibilidade demonstrada. Agradeço-lhe ainda o tema do trabalho, que sempre me aliciou, o que fez, a maioria das vezes, conseguir ultrapassar dificuldades surgidas.

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

Agradeço a toda a equipa do Laboratório de Patologia Clínica da Unidade Hospitalar (ULSNE) de Bragança, em especial à Doutora Maria José Montanha e a Técnica Angela Rodrigues. Toda a equipa do laboratório de Patologia Clínica foi parte integrante deste trabalho, colaborando em todo o processo laboratorial e de colheitas.

À minha amiga de sempre, Mestre Maria João Caldeira, agradeço o apoio e motivação incondicional o que ajudou a tornar este trabalho uma mais válida e agradável experiência de aprendizagem. Estou grata pela nossa amizade.

Aos meus pais, Fernando Pereira e Margarida Ferreira, um terno especial agradecimento pelo incentivo e confiança recebido ao longo deste percurso.

Ao meu namorado, Antonio Rodrigues pelo apoio dado ao longo deste percurso.

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

## RESUMO

Desde março de 2020 que a pandemia provocada pelo vírus SARS-CoV-2, tem vindo a causar milhares de mortes em todo o mundo. Esforços consideráveis foram feitos pela comunidade científica para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas contra a doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), acelerando o desenvolvimento de diferentes vacinas. A vacinação parece ser uma estratégia profilática eficaz, tendo havido resultados científicos que comprovam a redução da infeção, sintomatologia severa e morte associada à COVID-19. A infeção e a vacinação na COVID-19 induzem uma resposta de anticorpos contra glicoproteína viral Spike (S). Valores mais elevados destes anticorpos parecem conferir proteção, principalmente contra uma sintomatologia mais grave da doença. No entanto, o nível de anticorpos que podemos considerar como protetor e os fatores que estão na base da sua variação necessitam de mais investigação.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a imunidade humoral gerada pela vacinação em profissionais de saúde da Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança (ULSNE), antes da toma da primeira dose de reforço da vacina COVID-19, através de uma quantificação de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, no soro dos participantes. Pretendeu-se ainda identificar fatores que expliquem a variação interindividual na resposta humoral. Para o recrutamento dos participantes foi aplicado um questionário para o levantamento de características sociodemográficas e clínicas inerentes ao SARS-CoV-2. Os testes serológicos foram realizados em amostras de soro através de um Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA), ensaio SARS-CoV-2 IgG II (IgG anti- S/ RBD) e Quant e SARS-CoV-2 IgG Quant (IgG anti N) no equipamento ARCHITECT i1000SR (Abbott).

O estudo envolveu 427 profissionais de saúde, 338 (79,2%) mulheres e 89 (20,8%) homens, com uma média de idades de  $45,7 \pm 11,4$  anos, sendo a faixa etária dos 40 a 49 anos de idade a mais representada. Todos os participantes foram vacinados com o esquema de vacinação definido pelo Serviço Nacional de Saúde. Com base na positividade para os testes de RT-qPCR, verificou-se que 88 (20,6%) testaram positivo, 72 (16,7%) foram infetados por SARS-CoV-2 no período anterior à administração da vacina e 16 (3,7%) posteriormente à vacinação.

A incidência cumulativa de infecção por SARS-CoV-2 foi de 16.9% (IC95%: 13.3-20.4) no período posterior à vacinação. Na grande maioria dos participantes (n=422; 98.8%) foi detetada reatividade a anticorpos IgG anti-S/RBD. Foram identificadas diferenças significativas entre os grupos na análise quantitativa de anticorpos-S de acordo com a idade e a presença/ausência de infecção por SARS-CoV-2 ( $p < 0.001$ ). A faixa etária dos 20-29 apresentou valores mais elevados de anticorpos em relação a todas as outras faixas etárias, (mediana: 401.2 [IQR: 143.5;1040.1] BAU/mL). A análise de regressão multivariada evidenciou que a presença de infecção e a idade são os principais preditores da resposta humoral nos profissionais de saúde entre todas as variáveis estudadas.

No período anterior à vacinação com a dose de reforço, a avaliação da imunidade humoral revelou que a maior parte dos profissionais de saúde da ULSNE apresentava reatividade aos anticorpos anti-S permitindo concluir que houve resposta humoral à vacina. A variação interindividual nos níveis de anticorpos é principalmente explicada pelas diferenças de idade e pela presença de infecção.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; COVID-19; Vacinação; Anticorpos; IgG anti- S/RBD; IgG anti- N; Profissionais de Saúde.

## **ABSTRACT**

Since March of 2020, the pandemic caused by SARS-CoV-2 has been causing thousands of deaths worldwide. Considerable efforts have been made by the scientific community to develop preventive and therapeutic strategies against the coronavirus disease 2019 (COVID-19), accelerating the development of different vaccines. The administration of the vaccine appears to be an effective prophylactic strategy and there is scientific data showing that vaccination is responsible for reducing the number of infections, severe symptoms and deaths associated with COVID-19. Infection and vaccination in COVID-19 induce an antibody response against the Spike (S) viral glycoprotein. Higher values of these antibodies seem to provide protection, especially against more severe symptoms of the disease. However, the level of antibodies that we can consider as protective and the factors that underlie their variation need further investigation.

The main objective of this study was to evaluate the humoral immunity generated by COVID-19 vaccination in health professionals from Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) Bragança, before the administration of the booster dose of the COVID-19 vaccine, by means of a quantification of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies, in the serum of the participants. Another aim of this study was to identify factors that could explain the inter-individual variation in the humoral response.

For the participant's recruitment, a questionnaire was applied to survey the sociodemographic and clinical characteristics related to SARS-CoV-2 infection. Serological tests were performed on serum samples using a chemiluminescent microparticle based immunoassay (CMIA), SARS-CoV-2 IgG II (anti-S/RBD IgG), and SARS-CoV-2 IgG Quant (anti-N) on the ARCHITECT i1000SR Instrument (Abbott).

The study involved 427 health professionals, 338 (79.2%) women and 89 (20.8%) men with a mean, age of  $45.7 \pm 11.4$  years, with the 40-49 age group being the most represented. All participants were vaccinated with the vaccination schedule defined by the national health service. Based on positivity for SARS-CoV-2 RT-qPCR tests the data shown that 88 (20.6%) of the participants tested positive, 72 (16.7%) were infected within the period prior to vaccine administration, and 16 (3.7%) after vaccination.

The cumulative incidence of SARS-CoV-2 infection was 16.9% (95% CI: 13.3-20.4) in the period prior to the vaccination. In most participants (n=422; 98.8%) reactivity to anti-S/RBD IgG antibodies was detected. Significant differences in anti-S antibody levels were identified between groups according to age and the presence or absence of SARS-CoV-2 infection ( $p<0.001$ ). The 20-29 age group had significant higher antibody levels than all other age groups (median: 401.2 [IQR: 143.5;1040.1] BAU/mL;  $p<0.0001$ ). Multivariate regression analysis showed that the presence of infection and age are the main predictors of humoral response in health professionals among all the studied variables.

Before booster dose (3rd dose) vaccine the evaluation of humoral immunity revealed that most of the health professionals at the ULSNE showed reactivity to anti-S antibodies, allowing the conclusion that there was a humoral response to the vaccine. The inter-individual variation in antibody levels is mainly explained by age differences and the presence of infection.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV-2; Vaccination; Antibodies; IgG anti- S/ RBD; IgG anti-N; Healthcare Professional



## ÍNDICE

<b>DECLARAÇÕES .....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
1.1. Enquadramento epidemiológico .....	18
1.2. SARS-CoV-2 .....	20
1.3. Fisiopatologia da COVID-19.....	21
1.4. Vacinas COVID-19.....	27
1.5. Estudos serológicos.....	29
1.6. Fatores que podem influenciar a resposta imunológica à vacinação .....	32
<b>CAPÍTULO II – OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. População alvo e desenho do estudo .....	38
3.2. Seleção da amostra .....	39
3.3. Colheita de dados clínicos e laboratoriais .....	39
3.4. Procedimentos laboratoriais .....	40
3.5. Análise estatística .....	43
3.6. Considerações éticas.....	46
<b>CAPÍTULO IV – RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. Características sociodemográficas e clínicas dos profissionais de saúde .....	48

4.2. Incidência cumulativa de infecção por SARS-COV-2 .....	50
4.3. Reatividade aos anticorpos das proteínas Nucleocápside e Spike do vírus SARS-COV-2 .....	52
4.4. Determinação quantitativa de IgG anti- S/RBD e variação interindividual ....	53
4.5. Análise multivariada: Preditores da resposta humoral SARS-CoV-2 .....	55
4.6. Níveis de anticorpos que conferem proteção .....	57
<b>CAPÍTULO V – DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>
ANEXO I- Instrumento de recolha de dados.....	92
ANEXO II- Formulário de Consentimento .....	96
ANEXO III- Parecer da Comissão de Ética .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo dos principais eventos da pandemia SARS-COV-2 .....	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	20
<b>Figura 3.</b> Processo de transmissão, infecção e sintomatologia por SARS-CoV-2.....	23
<b>Figura 4.</b> Resposta imunológica mediada por anticorpos IgG anti-S/RBD.....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema vacinal COVID-19 .....	28
<b>Figura 6.</b> Desenho do estudo .....	38
<b>Figura 7.</b> Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA) Abbott. ....	42
<b>Figura 8.</b> Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-S/RBD e proteção contra a doença COVID-19 .....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características sociodemográficas e clínicas dos Profissionais de Saúde .....	49
<b>Tabela 2.</b> Incidência cumulativa de infecção por SARS-COV-2 antes da vacinação primária.....	51
<b>Tabela 3.</b> Resultados para a reatividade dos dois testes serológicos anti-S/RBD e anti-N .....	52
<b>Tabela 4.</b> Determinação quantitativa IgG anti-S/RBD e variação interindividual .....	54
<b>Tabela 5.</b> Correlação não paramétrica das variáveis contínuas com os níveis de anticorpos IgG anti-S/RBD .....	55
<b>Tabela 6.</b> Modelo linear generalizado para análise de preditores de anticorpos IgG anti-S/RBD.....	56

## ABREVIATURAS

ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2
AU	Unidades Arbitrárias
BAU	Unidade de Anticorpos de Ligação
CIMO	Centro de Investigação de Montanha
CMIA	Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes
COI	Cutoff index, (Ponto de corte)
COVID-19	<i>CoronaVirus Disease 2019</i> , (Doença do Coronavírus 2019)
DGS	Direção Geral de Saúde
E	Proteína de envelope do vírus SARS-COV-2
ECBS	Comitê de Especialistas em Padronização Biológica da OMS
EMA	Agência Europeia do Medicamento
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
EU	União Europeia
HCoV	<i>Human coronavirus</i> , (Coronavírus com capacidade de infetar humanos)
IC	Intervalo de Confiança
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMC	Índice de Massa Corporal
OMS	Organização Mundial de Saúde
M	Proteína Transmembranar do vírus SARS-COV-2
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> , (Síndrome Respiratória do Oriente Médio)
mL	Mililitro
MLG	Modelo Linear Generalizado
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
N	Proteína Nucleocápside do vírus SARS-COV-2
NIBSC	Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos

rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction, (Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)
RBD	<i>Receptor-binding domain</i> , (Domínio de ligação ao recetor)
RLU	Unidade de luz relativa
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , (Ácido Ribonucleico)
S	Proteína <i>Spike</i> do vírus SARS-COV-2
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> , (Síndrome Respiratória Aguda Grave)
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> , (Síndrome Respiratória Aguda Grave-2)
SISLAB	Sistema Integrado de Gestão Laboratorial
SNS	Serviço Nacional de Saúde
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease, serine 2</i> , (Protéase Transmembranar de Serina 2)
ULSNE	Unidade Local de Saúde do Nordeste
VOCs	Variantes de Preocupação

## INTRODUÇÃO

Em resposta à 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 Coronavírus 2019 (COVID-19) (Bonanni et al., 2021). Esta colaboração internacional não teve paralelo na história da Saúde Pública. As quatro vacinas aprovadas pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e administradas em Portugal, até a data deste estudo são: Comirnaty®, Spikevax®, baseadas em RNA mensageiro (mRNA); Vaxzevria®, Vacina Janssen®, baseadas em vetor adenoviral (Comissão Europeia, 2022; Infarmed, 2021).

Em Portugal, o processo de vacinação primária, 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 já existente uma dose de reforço (3ª dose) da vacina COVID-19 (Our World in Data, 2021; Serviço Nacional de Saúde, 2021). Nessa altura, cerca de 85% da população Portuguesa já se encontrava vacinada com o esquema de vacinação primário completo (Our World in Data, 2021; Serviço Nacional de Saúde, 2021). A estratégia de vacinação definiu grupos prioritários tendo em conta o risco/gravidade da doença COVID-19 e a exposição ao vírus SARS-CoV-2. Fazem parte deste grupo doentes imunocomprometidos, pessoas idosas e determinadas profissões como profissionais de saúde (Guiomar et al., 2022; Serviço Nacional de Saúde, 2022c). Estes foram priorizados por serem essenciais para manter as unidades de saúde em funcionamento, durante a pandemia, mas também por apresentarem risco de infeção por SARS-CoV-2 mais elevado, devido ao contato próximo com os pacientes (Guiomar et al., 2022). Até ao momento as vacinas têm demonstrado ser uma estratégia profilática eficaz para a prevenção e controlo da doença, diminuindo as hospitalizações e óbitos por COVID-19 (Bonanni et al., 2021; Moghadas et al., 2021).

Aos membros da União Europeia (EU) foi recomendado que fomentassem pesquisas serológicas em indivíduos vacinados, tanto em grupos específicos da população de risco como no público em geral, para avaliar e monitorizar a efetividade da vacina nas populações (Bonanni et al., 2021). Uma forma de medir a efetividade da vacina é através da quantificação de anticorpos específicos produzidos em resposta à sua administração.

Os testes serológicos são um recurso valioso para gerar evidências que permitam planejar políticas de saúde pública em futuros surtos ou pandemias, especialmente no contexto atual sobre a decisão de administração de doses adicionais de reforço da vacina COVID-19 (Bonanni et al., 2021). Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de avaliar a capacidade de os anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 e, em particular, os anticorpos neutralizantes, conferirem imunidade à infecção (Bonanni et al., 2021; Gallais et al., 2021; Guiomar et al., 2022). A monitorização da imunidade humoral é particularmente importante, uma vez que a cada instante novos tipos e marcas de vacinas são disponibilizadas ao público e o aparecimento de novas variantes do SARS-CoV-2 leva a necessidade de avaliar a sua efetividade (Bonanni et al., 2021; Guiomar et al., 2022; Moghadas et al., 2021).

O principal objetivo do estudo, aqui apresentado, foi avaliar de forma qualitativa e quantitativa a resposta humoral, gerada pela vacinação e/ou infecção, antes da toma da primeira dose de reforço (3ª dose) da vacina contra a COVID-19. A população alvo deste estudo foram profissionais de Saúde da Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) de Bragança. Pretendeu-se ainda identificar fatores que possam estar associados à variação interindividual na produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

Este trabalho foi efetuado no Centro de Investigação de Montanha (CIMO), em colaboração com a ULSNE de Bragança, através do Serviço de Patologia Clínica o qual disponibilizou as suas instalações, tendo prestado apoio em todo o processo de colheitas de amostras biológicas.

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.



## **CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO**

---

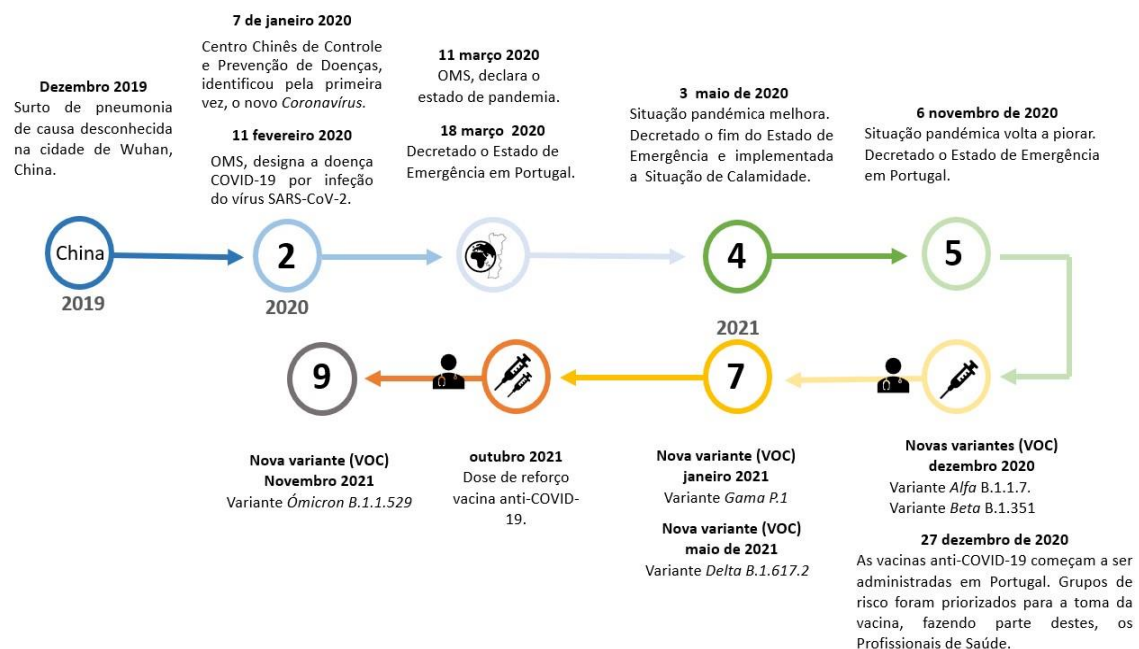
## 1.1. Enquadramento epidemiológico

Em dezembro de 2019, a cidade de Wuhan, China, tornou-se o centro de um surto de pneumonia de causa desconhecida, que viria a ser atribuída a um novo Coronavírus, SARS-CoV-2 (Muralidar et al., 2020). Este foi detetado pela primeira vez, a 7 de janeiro de 2020, pelo Centro Chinês de Controlo e Prevenção de Doenças e mais tarde a 11 de fevereiro de 2020 (Muralidar et al., 2020). A doença causada por este vírus viria a ser designada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a doença Coronavírus 2019 (COVID-19) causada pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2 (SARS-CoV-2) (World Health Organization, 2020b).

Tendo em conta a rápida disseminação e o aumento do número de casos de infeção por SARS-CoV-2 a nível global, OMS decretou a 11 de março de 2020, que a epidemia tinha atingido o nível de pandemia, constituindo assim uma calamidade pública (World Health Organization, 2020d). A situação pandémica evoluiu exponencialmente em todo o mundo e em particular, na União Europeia (World Health Organization, 2020a). Um dos primeiros relatórios publicado 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, 2020a).

Em Portugal, os primeiros casos registados de COVID-19 surgiram 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, a alta taxa de transmissibilidade do vírus SARS-CoV-2, o aparecimento de novas variantes, o aumento do número de casos confirmados de COVID-19, internamentos e óbitos, a inexistência de um tratamento específico levou o país a ter de se adaptar às várias realidades face à evolução da situação pandémica. Neste sentido o Estado de Emergência manteve-se deste o dia 18 de março até ao dia 2 de maio de 2020. Com a melhoria do contexto pandémico, a 3 de maio de 2020 é iniciado o plano de transição para uma situação de calamidade com aplicação faseada de medidas de desconfinamento. No entanto, a situação epidemiológica voltaria a piorar e o Estado de Emergência volta a ser implementado no dia 6 de novembro de

2020. A 27 de dezembro de 2020, as vacinas começam a ser administradas no país (Presidência de República, 2020c), sendo que no mês de outubro de 2021 foi adicionado ao programa de vacinação já existente uma dose de reforço da vacina COVID-19 (Serviço Nacional de Saúde, 2021). Após a descida do número de mortes, internamentos, bem como a redução da transmissibilidade e a estabilização do número de novos casos é por fim anunciada no dia 1 de maio de 2021 a não-renovação do Estado de Emergência e implementada a situação de Calamidade. Para além destes eventos, a situação de contingência e o estado de alerta foram várias vezes ativados no decorrer do ano 2020 e 2021 (Presidência de República, 2020a). Todas estas limitações foram impostas com o intuito de conter a transmissão do vírus e a expansão da doença, dentro dessas medidas mais restritivas, destacam-se os confinamentos gerais e parciais e fecho de fronteiras. Outras medidas, de carácter preventivo foram adotadas, para fazer face a pandemia. Estas visaram a promoção do distanciamento físico, o uso 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). A **Figura 1** apresenta uma linha do tempo que destaca os principais eventos da pandemia COVID-19.



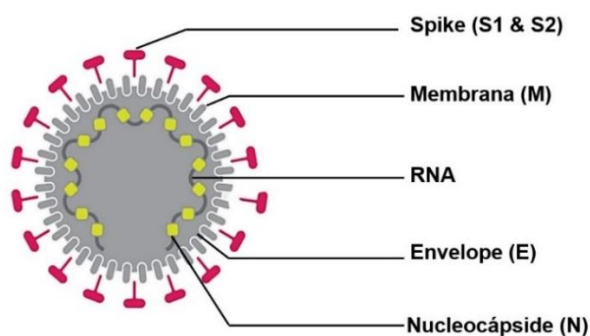
**Figura 1.** Linha do tempo dos principais eventos da Pandemia SARS-COV-2, (Muralidar et al., 2020; Presidência de República, 2020a, 2020c; Serviço Nacional de Saúde, 2021; World Health Organization, 2020b, 2020d, 2022).

## 1.2. SARS-CoV-2

### *Aspetos moleculares do vírus SARS-CoV-2*

O SARS-CoV-2 pertence a ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae*, da subfamília taxonómica *Orthocoronavirinae*, do género *Betacoronavirus* (Hasöksüz et al., 2020). Entre os agentes causadores de infeções do trato respiratório humano, estão os coronavírus. O SARS-CoV-2 é uma das sete estirpes de coronavírus conhecidas com capacidade de infetar humanos (HCoV) (Hasöksüz et al., 2020). Este pertence ao mesmo subgénero que os outros dois coronavírus, 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., 2020). 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).

Os coronavírus são os vírus com o genoma de RNA mais extenso entre os que foram descobertos até à data, apresentam 26 a 32 quilobases (Muralidar et al., 2020). O SARS-CoV-2 compreende 29.891 nucleotídeos que codificam 9.860 aminoácidos (Muralidar et al., 2020). Este é um vírus de RNA de cadeia simples de sentido positivo e envelopado. Constituído por 4 proteínas estruturais principais: a proteína da nucleocápside (N), a proteína transmembranar (M), a proteína de envelope (E) e a proteína *Spike* (S), (Hasöksüz et al., 2020). A estrutura do SARS-CoV-2 é ilustrada na **Figura 2**.



**Figura 2.** Estrutura do vírus SARS-CoV-2, adaptado de Bio-Rad e Muralidar (Bio-Rad & Laboratories, 2022; Muralidar et al., 2020)

A proteína N, tem a função de proteger o genoma viral das células hospedeiras. Desempenha também um papel na replicação do RNA e na resposta celular do hospedeiro à infecção viral (Hasöksüz et al., 2020; Machhi et al., 2020). As outras três proteínas estruturais (E, M, S) formam o envelope viral. A proteína mais abundante do lado de fora da membrana viral é uma proteína M. Esta atua de modo a ligar o genoma do ácido nucleico à superfície interna da membrana da célula hospedeira (Machhi et al., 2020). A proteína E, são pequenas proteínas integradas na membrana (M) com funções na morfogénese, montagem e brotamento do vírus (Machhi et al., 2020). A proteína S é a proteína que permite que o vírus se ligue à membrana celular de uma célula hospedeira permitindo a fusão celular e induz a produção de anticorpos neutralizantes (Hasöksüz et al., 2020). A proteína S contém 2 subunidades funcionais, S1 e S2; a subunidade S1, contém um domínio de ligação ao recetor (RBD) que é responsável pelo reconhecimento e ligação ao recetor da superfície celular. A subunidade S2 medeia a fusão das membranas virais e celulares (Hasöksüz et al., 2020).

### **1.3. Fisiopatologia da COVID-19**

#### ***1.3.1. Transmissão e infecção***

O vírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico da doença COVID-19, o qual tem vindo a causar uma mortalidade sem precedentes em todo o mundo. Este é transmitido de pessoa para pessoa por meio de gotículas ou contato direto com superfícies contaminadas (Machhi et al., 2020).

Quando o vírus SARS-CoV-2 entra pelas vias respiratórias nariz e garganta, ele é recebido pelo epitélio do aparelho respiratório superior, onde se encontra presente, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (Ahlawat et al., 2020). Esta enzima tem como função auxiliar a regulação da pressão sanguínea, sendo expressa em diversos órgãos nomeadamente no trato respiratório, digestivo e renal (Ahlawat et al., 2020). Essa localização, da ACE2 explica o tropismo tecidual do SARS-CoV-2 para o pulmão, intestino delgado e rim (Hasöksüz et al., 2020). A ACE2 desempenha um papel crucial na infecção. O SARS-CoV-2 usa como recetor a enzima ACE2 para entrar nas células hospedeiras após ativação da proteína S pela protease transmembranar de serina 2 (TMPRSS2) (Hoffmann et al., 2020), (**Figura 3**). A infecção por SARS-CoV-2 ocorre após a entrada do vírus na célula alvo, como consequência da união entre o RBD viral da

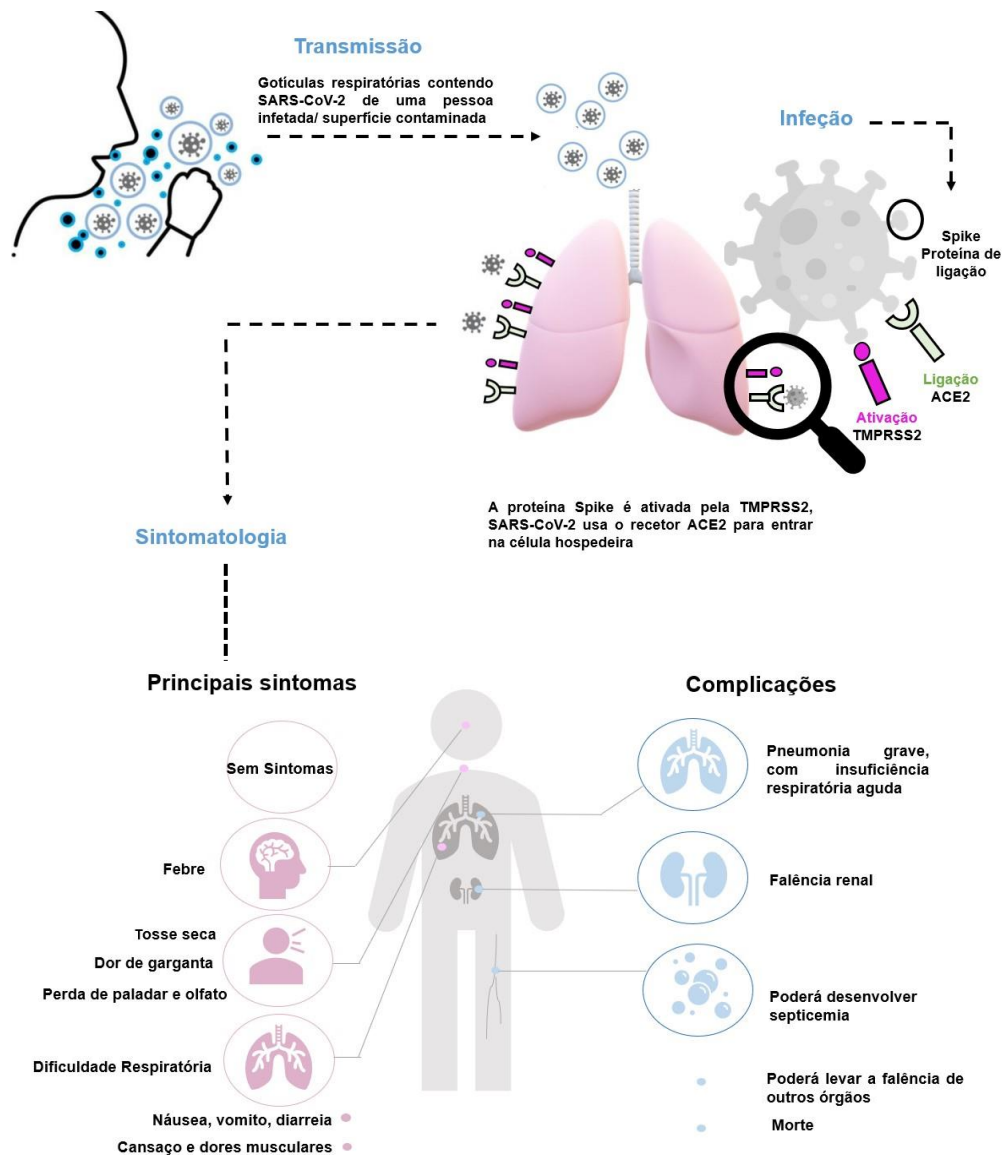
proteína S e o recetor ACE2 (Machhi et al., 2020). A proteína S vai acoplar ao ACE2 e sofrer uma divisão para que haja a fusão da membrana viral com a célula e endocitose, permitindo a libertação do RNA que está no interior do vírus na célula hospedeira (Hoffmann et al., 2020).

### ***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., 2020). Os sintomas mais comuns da COVID-19 tendem a aparecer cerca de 2 a 14 dias após a exposição ao vírus (CDC, 2021). 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 (CDC, 2021; Machhi et al., 2020). O processo de transmissão, infeção e sintomatologia associado ao vírus SARS-CoV-2 encontra-se ilustrado na **Figura 3**.

Na infeção grave por COVID-19, a rápida disseminação do vírus SARS-CoV-2 nos pulmões pode desencadear uma forte resposta imunológica, causada pela secreção excessiva de citocinas/quimiocinas e aporte de células pro-inflamatórias como granulócitos e macrófagos (Anka et al., 2021; Hu et al., 2021), provocando uma inflamação pulmonar e danos tecidulares (Muralidar et al., 2020). As quimiocinas são proteínas libertadas para enviar sinais para o recrutamento de células imunológicas para combater vírus (Machhi et al., 2020). Constituem uma resposta essencial para a autodefesa contra qualquer infeção. A “tempestade de citocinas” está intimamente associada ao desenvolvimento e progressão da síndrome respiratória aguda grave, que é considerada a principal causa de morte em pacientes com COVID-19, a qual está também correlacionada com um aumento significativo da taxa de mortalidade, especialmente pacientes com idade mais avançada (> 60 anos) e com doenças pré-existentes graves (Hu et al., 2021; Muralidar et al., 2020).

As populações de maior risco são: pessoas com idade igual ou superior a 65 anos; indivíduos com doenças crónicas; doenças oncológicas; pessoas imunocomprometidas; com problemas cardíacos e/ou pulmonares; pressão arterial alta; diabetes; obesidade (Bonanni et al., 2021; World Health Organization, 2021).

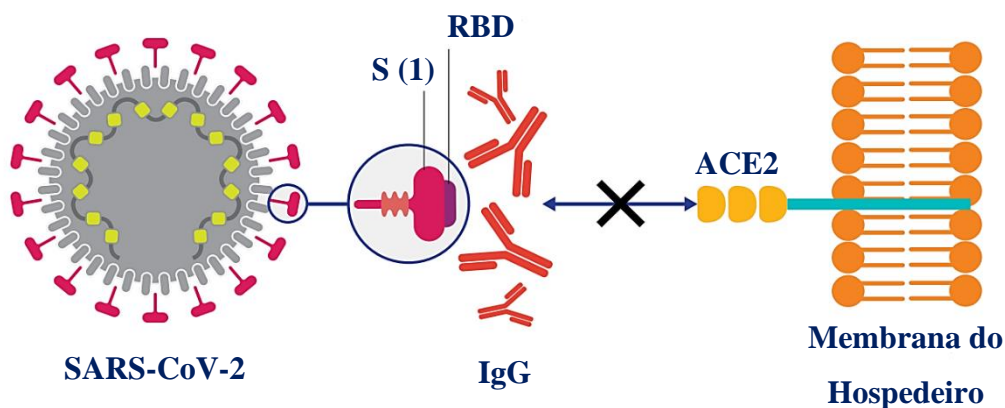


**Figura 3.** Processo de transmissão, infecção e sintomatologia por SARS-CoV-2. Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), protease transmembranar de serina 2 (TMPRSS2). Adaptado de Ahlawat (Ahlawat et al., 2020).

### 1.3.3. Resposta Imunológica Humoral: anticorpos IgG

A resposta imunológica compreende a imunidade inata e a imunidade adquirida, tanto a nível celular como humoral (Carrillo et al., 2021). Os principais contribuintes para a imunidade são: células T CD4+ que coordenam as respostas imunes; células B que produzem anticorpos contra vírus e células infetadas; células T CD8+ , que contribuem para a morte de células infetadas (Carrillo et al., 2021; Koch et al., 2021). A imunidade humoral é caracterizada pela produção de anticorpos pelas células B como resposta a antígenos. Os anticorpos são parte da resposta imunológica do corpo à infeção, e/ou vacinação, estimulando o sistema imunitário a formar células B de memória que produzem anticorpos neutralizantes, os quais tem capacidade de bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras (Narasimhan et al., 2021).

A resposta dos anticorpos pode ser direcionada contra várias proteínas virais do SARS-CoV-2, embora a proteína S e N sejam consideradas os principais alvos da resposta humoral (Carrillo et al., 2021). São particularmente importantes, os anticorpos dirigidos ao RBD da proteína S do SARS-CoV-2, impedindo a ligação com a ACE2 de forma a bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras (**Figura 4**).



**Figura 4.** Resposta imunológica mediada por anticorpos IgG anti-S/RBD dirigidas ao vírus SARS-CoV-2. Adaptado de Bio Rad (Bio-Rad & Laboratories, 2022)

A infeção por SARS-CoV-2 estimula a produção de anticorpos, como imunoglobulinas do tipo IgM, IgG e IgA específicos para SARS-CoV-2 (Wang et al., 2021). A IgM é a primeira classe de imunoglobulinas a ser produzida pelas células B, e assim domina as fases iniciais da resposta humoral, sendo a sua presença relativamente curta no tempo (Donno et al., 2021; Wang et al., 2021). A IgA é mais abundante nas



mucosas, mas também pode ser encontrada no soro e surge na primeira semana do início dos sintomas (Ong et al., 2021). Os anticorpos IgM e IgG aparecem alguns dias após a infeção por SARS-COV-2 (em média 10 dias), sendo que os IgMs são característicos da fase inicial e aguda da doença e diminuem progressivamente (Carrillo et al., 2021; De Donno et al., 2021). Os IgGs aumentam na fase de convalescença e diminuem mais lentamente (Carrillo et al., 2021; De Donno et al., 2021). Esta classe de imunoglobulinas, IgG são as mais detetadas em ensaios serológicos (Bonanni et al., 2021).

A deteção de IgG é importante devido à sua persistência ao longo do tempo. Títulos de anticorpos pós-infeção tendem a ser correlacionados com a gravidade da doença (De Donno et al., 2021). Indivíduos com sintomatologia grave, que precisaram de ser hospitalizados tendem a ter títulos de anticorpos mais altos do que aqueles com sintomatologia leve a moderada; enquanto que aqueles com infeções assintomáticas induzem títulos de anticorpos ainda mais baixos (Legros et al., 2021).

A duração destes anticorpos não está bem definida, sendo que ainda decorrem investigações nesta temática, sendo importante considerar que a não deteção de IgG nem sempre é indicativo de não infeção/imunização (Wang et al., 2021). Embora resposta imunitária associada a diferentes títulos de anticorpos e outras respostas imunes ainda não tenha sido totalmente determinada, é provável que os níveis de anticorpos forneçam informação sobre o risco e/ou gravidade de uma infeção futura. Esta é uma questão-chave que terá impacto na gestão da pandemia e determinará a utilidade dos estudos de seroconversão e o nível de imunidade de grupo.

#### ***1.3.4. Diagnóstico***

Os testes laboratoriais sensíveis e precisos são importantes, não só para o diagnóstico da COVID-19, mas também para controlo e vigilância sanitária face a pandemia associada ao vírus SARS-CoV-2 (Yüce et al., 2021).

O diagnóstico da COVID-19 é efetuado através de testes moleculares, testes de antigénio e, para além destes, dependendo dos sinais e sintomas do paciente, são realizados testes complementares de diagnóstico, tais como: testes serológicos; avaliação laboratorial de parâmetros bioquímicos; hematológicos; exames de imagem (Casella et al., 2020; Serviço Nacional de Saúde, 2022b).

O método da Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (*Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction - RT-qPCR*) é o método de referência para o diagnóstico e rastreio. Este confirma a presença do vírus SARS-CoV-2 responsável pela doença COVID-19, e tem a capacidade de detetar diretamente regiões específicas do genoma viral, sendo um método altamente sensível e útil para detetar infeções de maneira precoce (Yüce et al., 2021). Os seus resultados são conhecidos no prazo máximo de 24 horas após a prescrição (Serviço Nacional de Saúde, 2022b). Os testes de antigénio, são testes imunocromatográficos, estes utilizam uma metodologia simplificada, que ao contrário do teste RT-qPCR que detetam material genético do vírus, estes vão detetar de forma qualitativa antigénios específicos SARS-CoV-2 (Yüce et al., 2021). Estes testes são conhecidos como testes rápidos, em que os resultados são conhecidos após 15 a 30 minutos da realização, estes são úteis para identificar infeções agudas por SARS-CoV-2, e são utilizados numa primeira fase do diagnóstico, sendo complementado pelo exame RT-qPCR quando o resultado é positivo (Serviço Nacional de Saúde, 2022b; World Health Organization, 2021). Ambos os testes são feitos com amostras colhidas, através de zangaratoa, da região do nariz e/ou da faringe (Serviço Nacional de Saúde, 2022b; Yüce et al., 2021).

Os testes serológicos, são efetuados a partir de uma amostra de soro, colhida por punção venosa, permitem avaliar a presença de anticorpos específicos do vírus SARS-CoV-2 (Casella et al., 2020). Embora os testes serológicos não possam ser usados para diagnóstico da COVID-19, eles desempenham um papel complementar importante, avaliando pacientes com suspeita clínica de infeção quando o resultado teste RT-qPCR são repetidamente negativos (Wang et al., 2021). Este tipo de teste também é usado para monitorizar a resposta humoral às vacinas COVID-19 e infeção por SARS-CoV-2 (Casella et al., 2020; Wang et al., 2021). Todos estes testes laboratoriais possibilitam que a pessoa infetada receba o acompanhamento e tratamento adequado para além da toma de medidas necessárias para não infetar outras pessoas (Yüce et al., 2021).

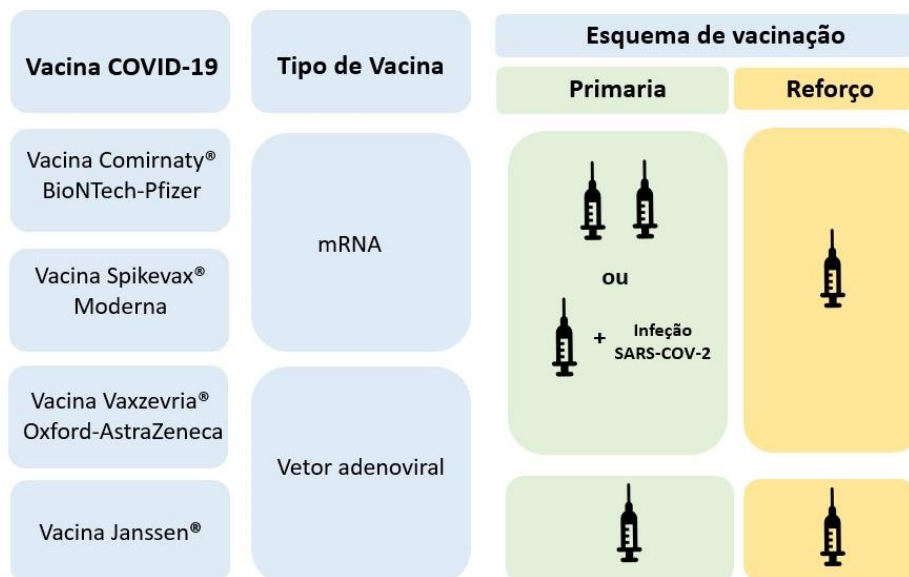
#### 1.4. Vacinas COVID-19

A vacinação é uma forma simples, segura e eficaz de adquirir proteção contra doenças infecciosas nocivas. Antes de entrar em contacto com o agente infeccioso, as vacinas treinam o sistema imunológico para criar anticorpos, de uma maneira muito similar, como quando uma pessoa é exposta a doença, tornando-a mais robusta e preparada para uma futura infeção (Calina et al., 2020). Esforços consideráveis 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. Esta colaboração não teve paralelo na história da Saúde Pública (Bonanni et al., 2021). A vacinação é uma importante medida de saúde pública para o controlo e prevenção da doença COVID-19 causada vírus SARS-CoV-2, cujo o 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., 2022; Serviço Nacional de Saúde, 2022c). Até ao momento, 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 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 (“3<sup>a</sup> 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 são: 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, 2022; Infarmed, 2021). Estas tem 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., 2022). Estas vacinas foram aprovadas pela Comissão Europeia e pela EMA na sequência de uma avaliação positiva relativamente à sua segurança e eficácia (Comissão Europeia, 2022).

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, 2022c). O esquema vacinal COVID-19 está exemplificado na **Figura 5**.



**Figura 5.** Esquema vacinal COVID-19 (Infarmed, 2021; Serviço Nacional de Saúde, 2022c, 2022a).

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, 2022c). Dos grupos prioritários (Presidência de República, 2020c), 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., 2022; Serviço Nacional de Saúde, 2022c).

### **1.5. Estudos serológicos**

A vacinação COVID-19 é uma ferramenta útil para alcançar a imunidade de grupo de forma a controlar a pandemia (Malipiero et al., 2021). No entanto, a eficácia das vacinas para a COVID-19 é difícil de prever, e ensaios de eficácia são demorados e de larga escala (Jin et al., 2021; Kadkhoda, 2021). Até a data, ainda não existe um valor padronizado universal que possa inferir de forma binária se uma pessoa está protegida da infeção por SARS-COV-2, sendo provável que os anticorpos sejam pelo menos parte da resposta protetora (Dimeglio et al., 2022; Kadkhoda, 2021). Portanto há uma necessidade urgente de correlatos imunológicos confiáveis e ferramentas laboratoriais capazes de medir e monitorizar a resposta imunológica, tanto gerada pela vacinação COVID-19 como pela infeção (Kadkhoda, 2021; Malipiero et al., 2021). Esta iniciativa é incentivada pela OMS (padrão 20/136) (Bentley et al., 2022; World Health Organization, 2020e). Uma das ferramentas utilizadas para avaliar a resposta imunológica à vacinação/ infeção são os estudos serológicos dirigidos a anticorpos específicos do vírus SARS-COV-2 de forma a avaliar a imunidade humoral (Uysal et al., 2022).

Os estudos serológicos, são essenciais na prevenção do risco de reinfeção e na determinação da durabilidade da proteção da vacinação (Casella et al., 2020; Wadhwa et al., 2021). Estes permitem detetar/ determinar níveis de anticorpos produzidos após infeção ou vacinação, e perceber a sua presença na população, de modo a estimar a imunidade conferida pela infeção/vacinação (Bonanni et al., 2021; Galipeau et al., 2020; Wadhwa et al., 2021). São também fundamentais para a vigilância de base populacional, formulação de políticas de saúde pública e para a perceção da disseminação do vírus

SARS-CoV-2 na comunidade de forma a avaliar a eficácia das estratégias de controlo da infeção (Ong et al., 2021).

Atualmente, as proteínas S e N do SARS-CoV-2 são os alvos mais usados em estudos serológicos para avaliação da imunidade pós-infeção e pós-vacinação (Bonanni et al., 2021; Guiomar et al., 2022; Wadhwa et al., 2021). Estudos efetuados no soro de pacientes que tiveram COVID-19 sugerem que as proteínas S e N são as proteínas mais imunogénicas e conseqüentemente, a probabilidade de prever o estado de imunidade pode aumentar em testes serológicos que visam estas proteínas (Decru et al., 2022; Ghaffari et al., 2020; Koch et al., 2021).

A proteína S do SARS-CoV-2, é o principal alvo utilizado no desenvolvimento de vacinas, uma vez que o RBD, na subunidade S1 desta proteína, é considerado o principal alvo para anticorpos de ligação e neutralização. Assim espera-se que pessoas vacinadas apresentem anticorpos IgG anti-Spike/RBD, enquanto pessoas com COVID-19 prévia podem apresentar anticorpos IgG anti-S/RBD e IgG anti-Nucleocápside (Guiomar et al., 2022; Wadhwa et al., 2021). De uma forma geral, os testes serológicos que avaliam os anticorpos da proteína S podem ser usados para avaliar a resposta imune à vacinação e também à infeção, enquanto os que são direcionados à proteína N podem servir para identificação da infeção natural, uma vez que esta proteína é considerada um marcador de infeção (Wadhwa et al., 2021).

Como já mencionado, a resposta imune pós vacinação ou infeção estão envolvidas várias respostas imunológicas. Entre elas a resposta inata, resposta humoral, resposta celular. Embora a resposta imune humoral constitua apenas uma parte da resposta imunológica, a resposta humoral é muito mais fácil de ser estudada do que as restantes devido ao seu amplo uso e padronização (Uysal et al., 2022). Existem diversas metodologias para avaliar a imunidade humoral, entre elas a avaliação de anticorpos totais, anticorpos de ligação e anticorpos neutralizantes (Cristiano et al., 2022; Hørritshøj et al., 2021; Whitaker et al., 2021). Estes últimos, representam a metodologia “padrão de ouro” na avaliação da imunidade humoral (Cristiano et al., 2022). No entanto, este tipo de testes (testes de neutralização) não são efetuados na rotina clínica hospitalar pois exigem culturas de células e procedimentos virais em laboratórios de biossegurança de nível 3 (Cristiano et al., 2022; Decru et al., 2022). Para além disso são procedimentos

demorados que exigem grande experiência técnica (Cristiano et al., 2022; Decru et al., 2022). Testes que detetam anticorpos IgG de ligação anti-S/RBD, através de imunoenaios, são amplamente utilizados na clínica hospitalar no auxílio ao diagnóstico, como em investigações epidemiológicas devido a sua facilidade de implementação (Cristiano et al., 2022; English et al., 2021; Harritshøj et al., 2021). Vários estudos foram efetuados com o intuito de comparar a congruência dos resultados das diversas metodologias utilizadas, verificando-se que existe uma forte correlação de títulos de anticorpos resultantes dos testes de neutralização e títulos de anticorpos IgG anti- S/RBD de ligação utilizados por imunoenaios (Cristiano et al., 2022; Giavarina & Carta, 2021; Padoan et al., 2020; Tiwari et al., 2021). Apesar da heterogeneidade da resposta imune SARS-CoV-2 entre indivíduos, o uso de imunoenaios pode auxiliar na monitorização em larga escala, tornando-se uma alternativa válida aos testes de neutralização (Cristiano et al., 2022).

Em apoio ao desenvolvimento e harmonização de ensaios serológicos para anticorpos COVID-19 usados para avaliar respostas à vacinação ou infeção, o Comité de Especialistas em Padronização Biológica da OMS (ECBS) estabeleceu um Padrão Internacional para imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 em conjunto com Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos (NIBSC) sob o código 20/136 em dezembro de 2020. O Padrão Internacional da OMS (NIBSC 20/136) expressa títulos de anticorpos neutralizantes em UI/mL e títulos de anticorpos de ligação em BAU/mL para comparar dados entre diferentes estudos usando ensaios de serologia, no contexto da pandemia COVID-19 (Bentley et al., 2022; Giavarina & Carta, 2021; Guiomar et al., 2022). Essa comparação é particularmente importante para a identificação de correlatos de proteção contra a COVID-19.

Desde o início da pandemia, a hipótese de diminuição da imunidade humoral levantou muitas preocupações sobre a proteção dos anticorpos de longo prazo contra a reinfeção e, por extensão, a durabilidade da proteção conferida pelas vacinas anti-COVID-19 (Gallais et al., 2021; Guiomar et al., 2022). A duração da resposta imune adaptativa ainda não foi completamente estabelecida. Alguns estudos demonstraram a prevalência de anticorpos em indivíduos previamente infetados durante, pelo menos, 12 meses (Dobaño et al., 2021; Gallais et al., 2021) e pelo menos 6 meses após o esquema vacinal completo em indivíduos vacinados sem episódio de infeção (Gallais et al., 2021;

Levin et al., 2021; Olariu et al., 2021). Embora seja um processo natural da imunidade humoral que a resposta dos anticorpos diminua ao longo do tempo, perceber o seu comportamento pós vacinal é crucial no atual período de pandemia (Uysal et al., 2022). Além disso, o ressurgimento da doença COVID-19 na população, leva à necessidade estudos de seroprevalência, e estes têm um papel importante na tomada de decisões sobre a necessidade e o momento de implementar doses de reforço e atividades suplementares de imunização (Bonanni et al., 2021).

### **1.6. Fatores que podem influenciar a resposta imunológica à vacinação**

Vários fatores podem influenciar a qualidade e a duração da resposta imunológica pós-infecção e pós-vacinação entre indivíduos (Carvalho & Paiva, 2021; Zimmermann & Curtis, 2019), tais como: fatores intrínsecos (idade, género, patologias, genética); fatores extrínsecos (imunidade preexistente, microbiota, infeções, medicação); fatores comportamentais (tabagismo, consumo de álcool, atividade física); fatores nutricionais como o índice de massa corporal (IMC); fatores ambientais; e diferenças relacionadas com a vacina.

Pessoas com mais de 60 anos têm um risco aumentado de doença grave e morte por COVID-19, especialmente aquelas com condições crónicas subjacentes. A resposta às vacinas geralmente é reduzida em indivíduos mais velhos devido à senescência imunológica (Bayram et al., 2021). Vários estudos demonstraram que a resposta dos anticorpos pós-vacinação foi inversamente proporcional à idade, sugerindo que a idade pode atuar como fator de risco na resposta imunológica à vacina (Bayram et al., 2021; Naaber et al., 2021; Uysal et al., 2022; Vilas Boas et al., 2021). No que diz respeito ao género, várias pesquisas concluíram que houve diminuição de anticorpos anti-S/RBD em indivíduos do género masculino (Gallais et al., 2021; Naaber et al., 2021; Uysal et al., 2022). Indivíduos com patologias associadas tendem a ter uma resposta imune reduzida à infeção ou vacinação (Bayram et al., 2021; Uysal et al., 2022). Verifica-se que o recetor ACE2, é mais abundantemente expresso no tecido adiposo em indivíduos obesos, predispõe à infeção em comparação com indivíduos com IMC normal. Por conseguinte o IMC é importante no prognóstico da infeção, bem como no nível da resposta imune pós-vacinal. Estudos demonstraram que o título de anticorpos foi menor nos participantes com IMC elevado (Gallais et al., 2021; Uysal et al., 2022). Sabe-se que os hábitos



tabágicos, produzem efeitos negativos na função pulmonar geral, aumentando o risco de infecções virais e bacterianas (gripe, pneumonia, tuberculose), e está associado a piores sintomas quando se é infetado (Han et al., 2019; Tengku Khalid et al., 2022). No caso da doença COVID-19, a expressão de ACE2 está aumentada nas células epiteliais alveolares pulmonares, em indivíduos com hábitos tabágicos. Existe um risco acrescido na gravidade das infecções pulmonares devido ao dano provocado nas vias áreas e à diminuição da função pulmonar (Engin et al., 2020; Patanavanich & Glantz, 2020). Um estudo efetuado em profissionais de saúde o qual relacionou indivíduos com hábitos tabágicos com o título de anticorpos IgG anti- S/RBD pós-vacinação, concluiu que estes foram menores em fumadores que em não fumadores (Uysal et al., 2022). Outros estudos concluíram que os títulos de anticorpos foram significativamente elevados naqueles que tiveram doença COVID-19 antes da vacinação do que naqueles que não tiveram (Bayram et al., 2021; Olariu et al., 2021).

Tendo em conta que as respostas imunes podem ser altamente heterogéneas entre indivíduos, vários trabalhos de investigação estão a ser desenvolvidos no sentido de perceber que fatores e qual o seu impacto na resposta imunológica à vacinação. No entanto, ainda pouco se sabe sobre quais e como estes podem afetar a resposta imunológica às vacinas anti-COVID-19. Uma compreensão de todos estes fatores e seu impacto no desenho das campanhas de vacinação vão permitir melhorar a imunogenicidade e eficácia da vacinação.

### ***Variantes***

Várias Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2, foram identificadas no decorrer da pandemia, pela OMS, levantando questões sobre a prevenção, tratamento e eficácia da vacina para a COVID-19 (World Health Organization, 2022).

Tal como outros vírus, o vírus SARS-CoV-2 é propenso a evolução genética, com desenvolvimento de mutações ao longo do tempo (Casella et al., 2020; World Health Organization, 2022). No geral a maioria das mudanças tem pouco ou nenhum impacto, no entanto outras podem afetar propriedades do vírus, podendo torná-lo mais transmissível, afetar a gravidade da doença, desempenho de vacinas, terapêuticas aplicadas, ferramentas de diagnóstico ou medidas de saúde pública (Casella et al., 2020; World Health Organization, 2022). Para uma variante do SARS-CoV-2 ser considerada

uma VOC, tem de estar associada a uma ou mais das seguintes alterações num grau de significância para a saúde pública global: aumento da transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia da COVID-19; aumento da virulência ou alteração na apresentação clínica da doença; diminuição da eficácia das medidas de saúde pública, ou terapêuticas disponíveis (World Health Organization, 2022). A vacinação provoca respostas imunes capazes de neutralizar o vírus SARS-CoV-2 (Garcia-Beltran et al., 2021). No entanto, o surgimento de variantes de preocupação (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 deste estudo, as duas VOCs de maior preocupação foram a variante Delta (B.1.617.2) e a variante Omicron (B.1.1.529) (World Health Organization, 2022), devido à sua alta transmissibilidade e aumento da virulência (Casella et al., 2020; Papanikolaou et al., 2022).

## **CAPÍTULO II – OBJETIVOS**

---

O principal objetivo deste estudo foi determinar de forma qualitativa e quantitativa anticorpos específicos, anti-SARS-CoV-2, numa amostra constituída por Profissionais de Saúde da Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) de Bragança, no período anterior à administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19 como forma de avaliar a proteção gerada pela vacinação.

Como objetivos específicos:

- Com a pesquisa na base de dados do SISLAB pretende-se quantificar a incidência acumulada de março de 2020 a novembro de 2021 (colheita). A partir destes valores será possível inferir o impacto da vacina no número de novos casos de infeção;
- 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 Spike e Nucleocápside;
- Identificar preditores que expliquem possíveis diferenças na resposta humoral dos participantes, tais como: idade, género, hábitos tabágicos, IMC, patologia associada e infeção prévia por SARS-CoV-2;
- Inferir a prevalência de indivíduos com nível de anticorpos que confere proteção.

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

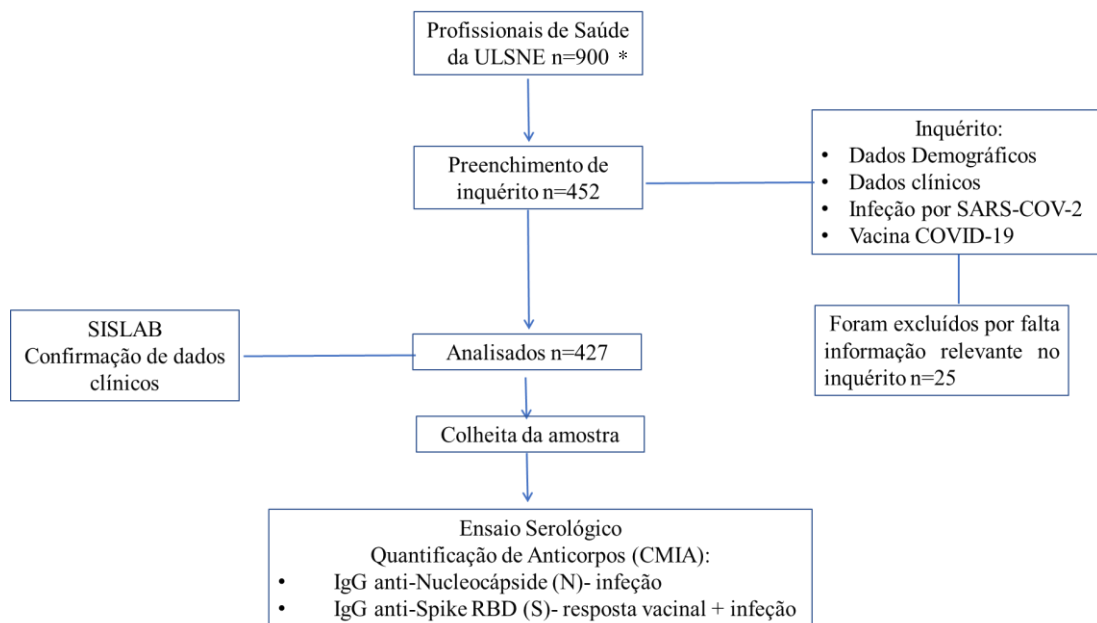
## **CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1. População alvo e desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal numa amostra não probabilística (**Figura 6**), de Profissionais da Saúde da Unidade Local de Saúde (ULSNE) de Bragança. A análise serológica realizou-se entre os dias 17/11/2021 a 30/11/2021 (primeira e última colheita de soro) antes da administração da primeira dose de reforço da vacina contra a COVID-19.

A escolha desta amostra prende-se sobretudo com as condições particulares de trabalho dos profissionais de saúde, uma vez que representam uma população de alto risco para doenças infecciosas. Além disso, os profissionais de saúde fazem parte do grupo prioritário para a administração de vacinas anti COVID-19 (Presidência de Republica, 2020c; Serviço Nacional de Saúde, 2022c) permitindo uma visão antecipada e mais objetiva da imunidade gerada pela vacinação. Estudar a resposta imunológica entre esses profissionais é importante para entender a disseminação do vírus SARS-COV-2 nas unidades de saúde.



**Figura 6.** Desenho do Estudo. Fluxograma representando o processo de recrutamento e as metodologias utilizadas.\* A ULSNE de Bragança é composta por 900 Profissionais de Saúde.

### 3.2. Seleção da amostra

Foram considerados elegíveis para este estudo todos os profissionais de saúde com atividade em meio hospitalar da ULSNE e com esquema vacinal completo (n=900). Considera-se esquema vacinal completo, duas ou uma dose mediante o tipo de vacina administrada, ou uma dose com episódio COVID-19 positivo (Serviço Nacional de Saúde, 2022a). Foram excluídos do estudo os indivíduos que já tinham recebido a dose de reforço da vacina COVID-19.

Os profissionais de saúde elegíveis foram contactados internamente, via email institucional, pelo próprio Serviço de Patologia Clínica. Através deste email, o profissional de saúde foi convidado a responder a um questionário elaborado na plataforma *Google Forms*, sobre questões sociodemográficas (sexo, idade, altura e peso); hábitos tabágicos (fumador ou não fumador); condições de saúde, tipo/marca de vacina administrada, número de doses administradas, incluindo se testou positivo para o SARS-CoV-2. Juntamente com o questionário, foi enviado um documento para obter o consentimento informado de participação no estudo (**Anexos I e II**). Dos elegíveis, aceitaram participar no estudo 452 indivíduos, dos quais 25 foram excluídos por falta de informação relevante no questionário. Assim, foram incluídos como participantes neste estudo, 427 profissionais de saúde da ULSNE de Bragança.

### 3.3. Colheita de dados clínicos e laboratoriais

#### *3.3.1 Sistema Integrado de Gestão Laboratorial*

O Sistema Integrado de Gestão Laboratorial (SISLAB) é um programa utilizado pelo Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança na sua rotina hospitalar. Este permite solicitar novas amostras, validar resultados, visualizar informação clínica do utente, visualizar a rotina de trabalho diária e imprimir etiquetas de identificação.

Através deste programa procedeu-se a impressão de etiquetas para identificação das amostras, solicitação do exame laboratorial para análise serológica, validação de resultados e consulta de informação clínica pertinente (consulta de diagnóstico de COVID-19 com teste molecular RT- qPCR positivo, anterior a colheita de soro). Extraíu-se, retrospectivamente os dados de todos os testes de RT-qPCR SARS-CoV-2 realizados de março de 2020 a novembro de 2021 da base de dados SISLAB, referente a população

em estudo. Para todos os participantes, infetados por SARS-COV-2 foi registado o tempo decorrido desde o teste RT-qPCR positivo. O tempo decorrido desde a última vacina administrada também foi registado.

### **3.4. Procedimentos laboratoriais**

Todos os procedimentos laboratoriais foram executados no Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança.

#### ***3.4.1 –Colheita da amostra***

Com base no número de indivíduos que responderam ao inquérito e elegíveis para integrar o estudo, foi elaborada uma listagem para proceder à colheita de soro, para análise sorológica. Foi formada uma equipa de colheitas constituída por Técnicos de Análises Clínicas pertencentes ao Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança, juntamente com a equipa de investigação ligada ao projeto: “Infeção por coronavírus SARS-CoV-2 no Nordeste de Portugal: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença”.

As colheitas de soro, foram efetuadas nas instalações do Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança e agendadas mediante as datas previamente marcadas para administração da primeira dose de reforço da vacina COVID-19 (novembro de 2021). As colheitas de soro foram efetuadas por meio de uma punção venosa (3-4 mL), em tubo seco S-Monovette® com gel. Todo o material de colheita foi fornecido pelo Laboratório de Patologia Clínica da ULSNE de Bragança. As amostras foram identificadas através de uma etiqueta previamente impressa, tendo em conta a lista de participantes. Esta identificação é composta por um código de barras único, o qual contém a informação do utente bem como o número de processo e o tipo de análise solicitada. Este procedimento foi efetuado através do programa SISLAB.

#### ***3.4.2 –Preparação e conservação da amostra***

As amostras de sangue foram centrifugadas 2500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, segundo as recomendação do fabricante (Sarstedt & Co, 2022) para separação do coágulo do soro. Após centrifugação, o soro foi obtido e conservado, refrigerado (2–8 °C) por um máximo 7 dias antes da análise laboratorial para deteção de anticorpos IgG



(Spike) e IgG (Nucleocápside) SARS-CoV-2 e, em seguida, foram armazenados congelados ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), segundo as diretrizes e recomendações do fabricante (Abbott Laboratories, 2022a, 2022b).

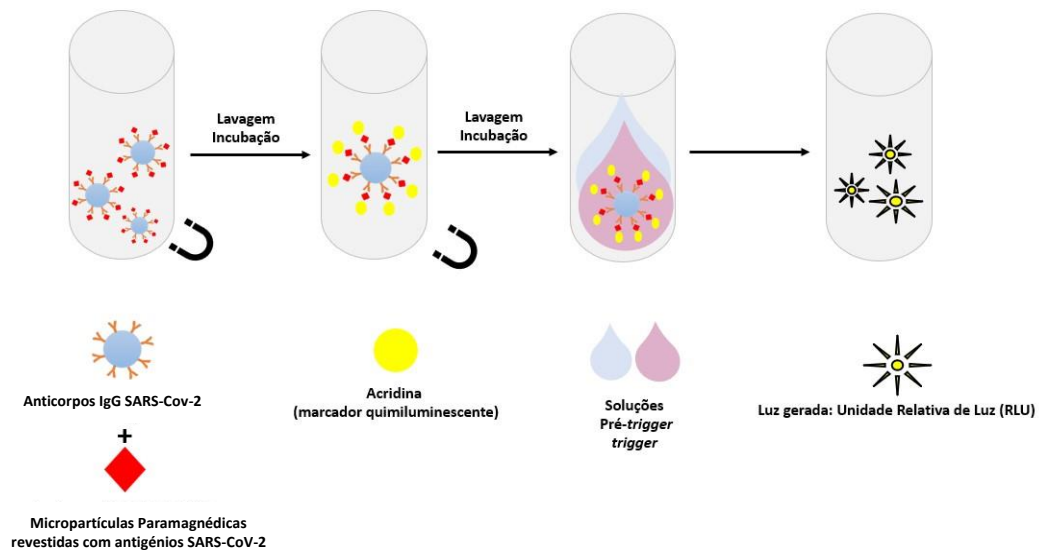
### 3.4.3 –Análise serológica

Os ensaios para a análise serológica foram realizados em amostras de soro, e analisadas no equipamento ARCHITECT i1000SR, segundo instruções do fabricante. Foi aplicado um Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA), ensaio SARS-CoV-2 IgG II Quant e SARS-CoV-2 IgG Quant (Abbott, Diagnostics Division, Sligo, Irlanda), (Abbott Laboratories, 2022a, 2022b).

A reação imunológica (reatividade) induzida pela vacinação foi detetada através do ensaio SARS-CoV-2 IgG II Quant, projetado para detecção quantitativa e qualitativa de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 do tipo IgG anti-spike (IgG anti- S/RBD) dirigidos ao RBD da subunidade S1 da proteína Spike do SARS-CoV-2 (Abbott Laboratories, 2022a). Este ensaio permite detetar anticorpos do tipo IgG anti- S/RBD, produzidos por indivíduos mediante infecção por SARS-CoV-2 e/ou vacinação para COVID-19 (Abbott Laboratories, 2022a).

Para detetar infecções anteriores por SARS-CoV-2, de forma a distinguir a resposta imunológica vacinal de uma infecção anterior por SARS-CoV-2, foi usado o ensaio SARS-CoV-2 IgG Quant, projetado para detecção qualitativa de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 do tipo IgG anti-N (Abbott Laboratories, 2022b).

Este ensaio CMIA é constituído por quatro etapas (**Figura 7**). Primariamente, é adicionado à amostra de soro, micropartículas paramagnéticas revestidas com antígeno SARS-CoV-2 em uma solução diluente, este conjugado é homogeneizado e incubado. Neste processo, os anticorpos IgG SARS-CoV-2 presentes na amostra irão ligar-se às micropartículas revestidas com antígeno SARS-CoV-2. Numa segunda fase, após um ciclo de lavagem é adicionado ao conjugado, um marcador quimiluminescente (acridina), e incubado. Numa terceira fase, é efetuado outro ciclo de lavagem, após este, são adicionadas as soluções *trigger* (pré-gatilho e gatilho). Na fase final a reação quimiluminescente resultante é medida como uma unidade de luz relativa (RLU), (Abbott Laboratories, 2022a, 2022b).



**Figura 7.** Imunoensaio de micropartículas quimioluminescentes (CMIA), Ensaio SARS-CoV-2 IgG II, (IgG anti 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 tem sido amplamente 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; Harritshøj et al., 2021).

#### 3.4.4 –Interpretação dos resultados

Os resultados obtidos foram interpretados segundo as orientações estipuladas pelo fabricante (AU/mL) as quais foram convertidas em unidades de ligação de anticorpos (do inglês: Binding Antibody Units; BAU/mL), segundo a última notificação recebida pela OMS, que define um padrão para interpretação de resultados para ensaios serológicos que visam avaliar a imunidade humoral anti-SARS-CoV-2 (Notice WHO Standard (20/136) Unit ConversionRN21040201) (Abbott Laboratories, 2022a, 2022b; World Health Organization, 2020e).

A presença de reatividade nos testes serológicos é definida por um ponto de corte estipulado pelo fabricante de acordo com a sensibilidade e especificidade do ensaio.

Os resultados do teste serológico para a proteína anti-S/RBD são dados em unidades arbitrárias por mL (AU/mL) que foram convertidos em unidades de ligação de anticorpos (BAU/mL) (Notice WHO Standard (20/136) Unit ConversionRN21040201). O ensaio Abbott quantifica anticorpos IgGs específicos anti-S/RBD no intervalo de 7 AU a um limite máximo de 40.000 AU (que corresponde ao intervalo de 1.0 a 11.360 BAU/mL). Para este teste, o resultado também pode ser interpretado sob a forma de ponto de corte, sendo o resultado considerado positivo para IgG-S/RBD (reatividade), quando apresentaram resultados  $\geq 50.0$  AU/mL ou seja  $\geq 7.1$  BAU/mL após a conversão (Abbott Laboratories, 2022a; World Health Organization, 2020e).

Para IgG anti-N o resultado foi dado na forma de presença e ausência, e as amostras de soro foram consideradas como presença com valores  $\geq 0,6$  COI, o que corresponde a  $\geq 7.1$  BAU/mL (Notice WHO Standard (20/136) Unit ConversionRN21040201) (Abbott Laboratories, 2022b; World Health Organization, 2020e).

### 3.5. Análise estatística

#### 3.5.1. Variáveis consideradas de resultado de interesse

A quantidade de anticorpos IgG anti-S/RBD foi considerada como o principal resultado de interesse tendo sido avaliada não só como variável contínua, mas também como variável dicotómica (positivo *versus* negativo) com base no ponto de corte acima referido. Em paralelo foi também considerada a deteção qualitativa de anticorpos.

#### 3.5.2. Potenciais preditores do nível de imunidade

Foram consideradas as seguintes variáveis: género, idade (20-29; 30-39; 40-49, 50-59 e  $\geq 60$  anos), grupo profissional em contacto direto com os doentes COVID-19 (sim ou não), reporte de patologias categorizados em: sem patologia, imunossupressão, doenças inflamatórias, devido a serem patologias com tratamento farmacológico potencialmente associado a alterações na resposta imunitária, e outras doenças. O IMC ( $< 25$  ou  $25-29.9$  ou  $\geq 30$ ), hábitos tabágicos (sim ou não), teste RT-qPCR positivo para

COVID-19 (não, sim antes do esquema vacinal, sim após o esquema vacinal), sintomas após infecção (sim ou não), sintomas após vacinação (sim ou não), esquema de vacinação e tipo/marca de vacina administrada também foram considerados.

### 3.5.3. *Análise estatística*

Foi avaliada a distribuição dos participantes recorrendo a estatística descritiva, de acordo com as variáveis sociodemográficas e clínicas.

A incidência cumulativa de infecção por COVID-19 antes do esquema vacinal primário foi calculada para o período entre março 2020 a dezembro de 2020 com base no número de infeções reportadas pelos participantes. Foi calculada respetivamente a incidência cumulativa, de infecção por COVID-19 depois do esquema vacinal primário completo, para o período entre fevereiro 2021 a novembro 2021 (desde o momento em que este grupo completou o esquema de vacinação primário até momento da colheita de soro para análise serológica), com base no número de infeções reportadas pelos participantes. A incidência cumulativa e respetivo intervalo de confiança a 95% foi calculado no global da amostra e para as diferentes categorias de acordo com o género, idade, IMC, hábitos tabágicos e ser profissional de saúde com contacto direto com doentes COVID-19. As comparações entre grupos foram feitas utilizando o teste de qui-quadrado.

A reatividade aos anticorpos anti-N e anti-S/RBD SARS-CoV-2 foi dada em resultado qualitativo (presença/ ausência), de acordo com o ponto de corte definido anteriormente e determinado pelo fabricante (anti N  $\geq 0.6$  ou anti-N  $< 0.6$  COI) , (anti-S/RBD  $\geq 7.1$  ou  $< 7.1$  BAU/mL).

Foi feita a avaliação quantitativa de anticorpos anti-S/RBD recorrendo a análise bivariada, estimou-se a sua associação com as variáveis sociodemográficas e clínicas. Como esta variável não segue distribuição normal de acordo com o teste *Kolmogorov-Smirnov* ( $p < 0.001$ ), esta quantificação é apresentada como mediana e intervalo interquartil (IQR). A associação entre cada uma das variáveis sociodemográficas e clínicas operacionalizadas como categóricas e o nível de anticorpos anti- S/RBD baseou-se na comparação entre grupos recorrendo a testes não paramétricos; teste *U de Mann-Whitney* (variáveis dicotómicas) e teste de *Kruskal-Wallis* (variáveis com mais de duas categorias).

Para as variáveis clínicas que correspondem ao número de dias desde a vacinação (para todos os participantes) e ao número de dias desde a ocorrência de infecção (para participantes com diagnóstico molecular de infecção), a associação com o nível de anticorpos anti- S/RBD, foi avaliada recorrendo ao coeficiente de correlação de *Spearman* ( $r_s$ ) e respetivo valor-*p*. Na variável, “número de dias desde a ocorrência de infecção”, dos 88 participantes somente foi possível obter informação de 68 indivíduos.

Para estimar potenciais preditores do nível de anticorpos anti- S/RBD foi conduzida análise multivariada recorrendo ao modelo linear generalizado (MLG). Esta abordagem estatística permite maior flexibilidade na avaliação de variáveis preditoras em relação a uma variável dependente tendo em conta um leque variado de distribuições, ou seja, não exige o pressuposto de normalidade da distribuição (Arnold et al., 2021). O MLG permite que o modelo de regressão linear se relacione com a variável dependente, por meio de uma função de ligação. Tendo em conta que esta variável admite apenas números positivos e apresenta uma distribuição com evidente desvio à direita, optou-se por um MLG com distribuição gama e função log (a variável dependente é transformada no logaritmo). A variável dependente é a concentração de anticorpos anti- S/RBD. Foram introduzidas no modelo as variáveis consideradas potenciais preditoras e que apresentaram associação estatisticamente significativa com o nível de anticorpos anti- S/RBD na análise bivariada. A variável “esquema de vacinação” não foi incluída no MLG. Foram obtidos os coeficientes de regressão ( $\beta$ ). Pelo facto de ter sido usado um MLG com distribuição gama e função log, foi obtido o exponencial de cada coeficiente de regressão ( $\exp\beta$ ) e respetivo IC95%. O exponencial dos coeficientes de variáveis categóricas representa a razão entre a média da variável dependente para uma determinada categoria e a média da variável dependente da categoria de referência. Para variáveis contínuas o exponencial do coeficiente de regressão após subtrair uma unidade e multiplicar por 100 representa a percentagem de aumento ou de redução da variável dependente por cada unidade de aumento da variável preditora.

Todos os dados obtidos através do inquérito bem como os resultados obtidos através do exame laboratorial serológico, foram compilados numa folha de Microsoft Excel, versão 2019 (Microsoft Corp, Redmond, WA, EUA). As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Science, IBM), versão 23. Os valores estimados para a incidência acumulada e respetivos

intervalos de confiança a 95% foram obtidos com recurso ao *software* WinPepi, versão 11.63 de 2016. Considerou-se o nível de significância a 0,05.

Para inferir a prevalência 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), em que para valores < 40 BAU/mL foi considerado risco elevado de infeção, 40 a 260 BAU/mL risco médio, > 260 BAU/mL risco baixo de infeção por SARS-CoV-2.

### **3.6. Considerações éticas**

O estudo atendeu aos requisitos legais e éticos pertinentes. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Saúde da ULSNE de Bragança, disponível para consulta no **Anexo III**. Todos os participantes, forneceram o seu consentimento por escrito autorizando a colheita de amostras sanguíneas para análise serológica, e recolha de dados sobre informações demográficas, sociais e de saúde; bem como a consulta de diagnósticos de COVID-19 efetuados, por meio de testes de antígeno ou RT- qPCR, anterior a colheita de sangue. Todos os participantes, foram informados a pertinência, dos objetivos e metodologia aplicadas neste estudo. Além disso também foram informados de que as amostras biológicas colhidas poderiam ser usadas no âmbito de pesquisas futuras envolvendo estudos para determinar o risco de infeção por SARS-Cov-2. A confidencialidade dos dados dos participantes foi assegurada mediante atribuição de um número interno exclusivo a cada indivíduo.

## **CAPÍTULO IV – RESULTADOS**

---

#### 4.1. Características sociodemográficas e clínicas dos profissionais de saúde

Os resultados apresentados dizem respeito a indivíduos com esquema de vacinação primário completo, com colheita de soro para análise da resposta humoral SARS-COV-2, antes da toma da primeira dose de reforço (3ª dose) da vacina COVID-19. Este estudo envolveu 427 profissionais de saúde da ULSNE de Bragança, 338 (79,2%) mulheres e 89 (20,8%) homens. Com uma média de idades  $45,7 \pm 11,4$  anos, sendo a faixa etária 40 a 49 anos de idade, ( $n=138$ ; 32,3%) a mais representada nesta amostra. As características sociodemográficas e clínicas dos participantes deste estudo estão categorizadas na **Tabela 1**.

No que diz respeito a distribuição por categoria profissional, verificou-se que 29 (6,8%) Médicos, 139 (32,6%) Enfermeiros, os quais representam grande parte dos participantes; 41(9,6%) Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, 77 (18%) assistentes Técnicos Administrativos, 67 (15,7%) Assistentes Operacionais e 74 (17,3%) pertenciam a outras funções do meio hospitalar. Considerando a exposição ocupacional, a maioria dos profissionais de saúde ( $n=271$ ; 63,5%), declarou trabalhar em contacto direto com doentes COVID-19.

No que se refere a condição de saúde dos participantes, verificou-se que a maioria 276 (64,6%) não reportou nenhuma patologia. Do restante número de participantes, 31 (7,3%) declararam ter doenças inflamatórias, 14 (3,3%) doenças imunossupressoras e 106 (24,8%) declararam ter outras doenças. Fazem parte da categoria “outras doenças”, maioritariamente doenças metabólicas, tais como: anemia, tensão arterial elevada, dislipidemia e diabetes *mellitus* tipo II. Quanto ao IMC, 232 (54,3%) profissionais de saúde apresentaram IMC normal (IMC: 19,0-24,9), 132 (14,9%) estavam em sobrepeso (IMC: 25,0-29,9) e 63 (14,8%) apresentavam-se obesos (IMC:  $\geq 30$ ). Relativamente aos hábitos tabágicos, 346 (81%) profissionais de saúde afirmaram não ter hábitos tabágicos e 81 (19%) afirmaram que sim.

Com base na positividade do teste RT-qPCR verifica-se que grande parte dos profissionais de saúde 339 (77,8%) não testaram positivo para SARS-CoV-2 e 88 (20,6%) testaram positivo. Destes 88,72 (16,7%) foram infetados por SARS-CoV-2 no período anterior ao programa de vacinação primário, e 16 (3,7%) após vacinação primária completa. De todos os profissionais de saúde 234 (54,8%), a maioria não apresentou



sintomas depois de infetados por SARS-COV-2 e 193 (45,2%) afirmaram ter tido sintomas. A maioria dos profissionais de saúde incluídos no estudo foram vacinados com vacinas baseadas em tecnologia de mRNA. A maioria dos participantes, (n=389: 91,1%), foram inoculados com a vacina mRNA BNT162b2 COMIRNATY®, e 22 (5,2%) com a mRNA-1273-Spikevax®. Os restantes profissionais de saúde foram inoculados com as vacinas de vetor de adenovírus, ChAdOx1 nCoV-19 -Vaxzevria® (n=9; 2,1%) e Ad26COV2-S-COVID-19 Vacina Janssen® (n=7; 1,6%).

**Tabela 1.** Características sociodemográficas e clínicas dos Profissionais de Saúde

Caraterísticas	N	%
<b>Género</b>		
Feminino	338	79,2
Masculino	89	20,8
<b>Faixa etária</b>		
20-29	39	9,1
30-39	105	24,6
40-49	138	32,3
50-59	85	19,9
60-69	60	14,1
<b>Grupo profissional</b>		
Médicos	29	6,8
Enfermeiros	139	32,6
Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica	41	9,6
Assistentes Técnicos Administrativos	77	18,0
Assistentes Operacionais	67	15,7
Outras funções em meio hospitalar	74	17,3
<b><sup>a</sup> Contacto direto com doentes COVID-19</b>		
Não	156	36,5
Sim	271	63,5
<b><sup>b</sup> Patologias</b>		
Sem Patologia	276	64,6
Doenças Inflamatórias	31	7,3
Imunossupressão	14	3,3
Outras Doenças	106	24,8

<sup>a</sup> Profissionais de Saúde em contacto direto com doentes COVID-19; <sup>b</sup> Patologias e tratamento farmacológico potencialmente associado a alterações na resposta imunitária.

**Tabela 1.** Continuação: Características sociodemográficas e clínicas dos Profissionais de Saúde

Caraterísticas	N	%
<b>IMC</b>		
19.0-24.9	232	54,3
25.0-29.9	132	30,9
≥30.0	63	14,8
<b>Hábitos Tabágicos</b>		
Não	346	81,0
Sim	81	19,0
<b>COVID-19 (RT-qPCR<sup>c</sup>)</b>		
Não	339	77,8
Sim, Antes da Vacinação	72	16,9
Sim, Após a Vacinação	16	3,7
<b>Sintomas após a infecção</b>		
Não	21	4,9
Sim	67	15,7
<b>Vacina Administrada</b>		
COMIRNATY®	389	91,1
Spikevax®	22	5,2
VAXZEVRIA®	9	2,1
Vaccine Janssen	7	1,6
<b>Sintomas após a vacinação</b>		
Não	234	54,8
Sim	193	45,2

<sup>c</sup> Diagnóstico Covid-19 RT-qPCR positivo de março 2020 a novembro 2021 (SISLAB), antes e/ou após o esquema vacinal primário completo.

#### 4.2. Incidência cumulativa de infecção por SARS-COV-2

Entre março 2020 e dezembro de 2020, dos 427 profissionais de saúde, 72 (**Tabela 1**) tiveram diagnóstico molecular (RT-qPCR<sup>+</sup>) de COVID-19. A incidência cumulativa durante esse período de tempo foi de 16,9% com IC95% entre 13,3% e 20,4%. Dos 427 participantes, apenas 16 foram infectados após o esquema vacinal (fevereiro 2021 a novembro de 2021) (**Tabela 1**), o que significa que a incidência cumulativa para este período de tempo foi de 3,7% com IC95% entre 2,0% e 6,0%. A **Tabela 2** apresenta a incidência cumulativa e respectivo IC95% estratificado de acordo com as características dos

profissionais de saúde relativamente ao período antes do esquema vacinal primário (n=72). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre grupos de acordo com o género ( $p=0,264$ ), idade ( $p=0,353$ ), IMC ( $p=0,143$ ), hábitos tabágicos ( $p=0,910$ ), ser profissional em contacto direto com doentes COVID-19 e as patologias reportadas ( $p=0,989$ ). Foi verificado que incidência cumulativa referente ao período pós-vacinal não obteve significância devido ao número exíguo de profissionais de saúde (n=16).

**Tabela 2.** Incidência cumulativa de infeção por SARS-CoV-2 antes da vacinação primária

<b>Incidência cumulativa</b>	<b>% (IC 95%)</b>	<b>p*</b>
<b>Género</b>		
Mulher	18,1 (14,0 – 22,2)	0,264
Homem	12,4 (5,5 – 19,2)	
<b>Faixa etária</b>		
20-29	27,0 (12,7 – 41,3)	0,353
30-39	19,1 (11,2 – 27,1)	
40-49	14,8 (9,1 – 20,5)	
50-59	16,9 (8,8 – 24,9)	
60-69	12,5 (4,4 – 20,6)	
<b>Contacto direto com doentes COVID-19</b>		
Não	15,4 (9,7 – 21,1)	0,628
Sim	17,7 (13,2 – 22,3)	
<b>Patologias</b>		
Sem Patologia	20,7 (15,9 – 25,4)	0,989
Doenças Inflamatórias	22,6 (7,9 – 37,3)	
Imunossupressão	21,4 (0,0 – 42,9)	
Outras doenças	19,8 (12,2 – 27,4)	
<b>IMC</b>		
19.0-24.9	13,9 (9,4 – 18,4)	0,143
25.0-29.9	20,0 (13,1 – 26,9)	
≥30.0	23,0 (12,4 – 33,5)	
<b>Hábitos Tabágicos</b>		
Não	16,8 (12,8 – 20,7)	0,910
Sim	17,3 (9,1 – 25,5)	

<sup>a</sup> Profissionais de Saúde em contacto direto com doentes Covid-19. \* Valor de  $p$  considerado significativo para valores inferiores a 0,05

### 4.3. Reatividade aos anticorpos das proteínas Nucleocápside e Spike do vírus SARS-COV-2

Um total de 427 amostras serológicas provenientes de profissionais de saúde da ULSNE foram testadas para a quantificação de anticorpos IgG anti- S/RBD, dirigidos ao RBD da subunidade S1 da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2. Em grande parte da amostragem (n=422; 98,8%) foi detetada reatividade, o que pode ser interpretado como resposta imune à vacinação, e em apenas 5 (1,2%) amostras não se detetou reatividade (anti- S/RBD <7,1 BAU/mL).

As mesmas 427 amostras foram testadas para deteção de anticorpos IgG anti-N SARS-COV-2, tendo sido observada reatividade em 42 (Total de N<sup>+</sup>= 26+16) amostras (9,8%). Destas 42 amostras N (+), 16 correspondem a indivíduos que não reportaram infeção COVID-19 o que pode ser interpretado como infeção não diagnosticada a nível molecular.

A **Tabela 3** apresenta a distribuição de indivíduos de acordo com a deteção de reatividade aos anticorpos das proteínas N e S do vírus SARS-CoV-2, estratificado de acordo com ter ou não ter reportado diagnóstico molecular de infeção (RT-qPCR).

**Tabela 3.** Resultados para a Reatividade dos dois testes serológicos anti- S/RBD e anti-N

RT-qPCR		S (-)	S (+)	Total
Positivo [n (%)]				
RT-qPCR (+)	N (-)	2 (2,3%)	60 (68,2%)	62 (70,5%)
	N (+)	0 (0%)	26 (29,5%)	26 (29,5%)
<b>Total (+)</b>		<b>2 (2,3%)</b>	<b>86 (97,7%)</b>	<b>88 (100%)</b>
RT-qPCR (-)	N (-)	3 (0,9%)	320 (94,4%)	323 (95,3%)
	N (+)	0 (0,0%)	16 (4,7%)	16 (4,7%)
<b>Total (-)</b>		<b>3 (0,9%)</b>	<b>336 (94,4%)</b>	<b>339 (100%)</b>
<b>Total</b>		<b>5 (1,2%)</b>	<b>422 (98,8%)</b>	<b>427 (100%)</b>

**N (+,-):** Resultado qualitativo (positivo/negativo) para a análise dos anticorpos IgG anti-N de acordo com o ponto de corte definido anteriormente (anti N  $\geq$  0,6 ou anti-N < 0,6); **S (+,-):** Resultado qualitativo para os anticorpos IgG anti-S (anti- S/RBD  $\geq$  7,1 ou < 7,1 BAU/mL) de acordo com o ponto de corte definido pelo fabricante.

#### 4.4. Determinação quantitativa de IgG anti- S/RBD e variação interindividual

Determinação quantitativa dos anticorpos anti-S/RBD em relação às variáveis descritivas categóricas apresenta-se na **Tabela 4**.

De acordo com os resultados observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) nos níveis de anticorpos S/RBD, na faixa etária, histórico de COVID-19 (RT-qPCR), e no esquema vacinal. Em relação à faixa etária, observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ), nas idades entre 20-29 anos (401,2 [143,5;1040,1] BAU/mL) em relação às restantes faixas etárias. Observou-se uma diferença significativa ( $p = < 0,001$ ) nos níveis de anticorpos anti- S/RBD obtidos entre os indevidos com histórico de COVID-19 (RT-qPCR) positivo, sendo estes valores mais elevados em indivíduos que foram infetados após o esquema de vacinação primário completo (1629,7 [305,6; 5584,6] BAU/mL). Também se constatou que os títulos de anticorpos anti-S/RBD são significativamente mais elevados, tanto antes como depois da vacinação primária completa (554,1 [213,4; 1331,4] BAU/mL) e (1629,7 [305,6; 5584,6] BAU/mL), em relação aqueles que não tiveram histórico de infeção por SARS-CoV-2 (80,0 [44,6; 164,7] BAU/mL).

Nos indivíduos que não foram infetados por SARS-CoV-2, verifica-se que os níveis de anticorpos anti-S/RBD são mais elevados em participantes que foram vacinados com a vacina Spikevax®, (634,2 [202,0; 1221,0] BAU/mL;  $p < 0,001$ ). Nos indivíduos infetados encontramos esquemas de vacinação diferentes. Dos infetados que foram vacinados com a vacina COMIRNATY®, 36 foram inoculados apenas com uma dose, e 40 foram inoculados com duas doses. Os que foram vacinados com Spikevax®, todos os infetados foram inoculados com uma dose, e estes são os que apresentam níveis mais elevados de anticorpos anti-S/RBD. A comparação destes grupos é dificultada pela diversidade de esquemas de vacinação, bem como pela diferença considerável de número de indivíduos por tipo/marca de vacina, visto que estas (Spikevax®, VAXZEVRIA®, Vaccine Janssen®) terem sido administradas de acordo com disponibilidade das mesmas.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas, nos níveis de anticorpos S/RBD; no género ( $p = 0,244$ ), contacto direto com pacientes COVID-19 ( $p = 0,469$ ), patologias ( $p = 0,514$ ), IMC ( $p = 0,199$ ), hábitos tabágicos ( $p = 0,277$ ), sintomas após infeção ( $p = 0,812$ ) e sintomas após vacinação ( $p = 0,456$ ).

**Tabela 4.** Determinação quantitativa de IgG anti- S/RBD e variação interindividual

Variáveis	N	Anti-S/RBD (BAU/mL) Mediana [IQR]	p*
<b>Género</b>			
Feminino	338	113,1 [53,6; 325,0]	<b>0,244</b>
Masculino	89	79,0 [52,5; 242,3]	
<b>Faixa etária</b>			
20-29	39	401,2 [143,5;1040,1]	<b>&lt;0,001</b>
30-39	105	124,3 [61,8; 375,6]	
40-49	138	79,4 [39,3; 200,4]	
50-59	85	99,5 [54,6; 292,0]	
60-69	60	83,7 [48,0; 232,7]	
<b><sup>a</sup> Contato direto com doentes COVID-19</b>			
Sim	271	110,3 [59,4; 947,2]	<b>0,469</b>
Não	156	87,6 [39,4; 459,1]	
<b><sup>b</sup> Patologias</b>			
Sem Patologia	276	116,1 [56,2; 346,1]	<b>0,514</b>
Imunossupressão	14	94,4 [15,0; 204,3]	
Inflamatórias	31	146,0 [51,1; 377,4]	
Outras Doenças	106	88,6 [49,8; 223,5]	
<b>IMC</b>			
19.0-24.9	230	99,2 [50,0; 262,7]	<b>0,199</b>
25-29.9	134	119,2 [54,0; 386,3]	
≥=30	63	112,2 [54,8; 634,3]	
<b>Hábitos Tabágicos</b>			
Sim	81	96,7 [44,0; 244,5]	<b>0,277</b>
Não	346	105,9 [54,6; 324,0]	
<b><sup>c</sup> COVID-19 (RT-qPCR+)</b>			
Não	339	80,9 [44,6; 164,7]	<b>&lt;0,001</b>
Sim, Antes da Vacinação	72	554,1 [213,4; 1331,4]	
Sim, Após a Vacinação	16	1629,7 [305,6; 5584,6]	
<b>Sintomas após infeção</b>			
Sim	67	687,4 [284,0; 1596,7]	<b>0,812</b>
Não	21	369,3 [184,4;1656,1]	
<b>Sintomas após vacinação</b>			
Sim	193	110,3 [55,9; 296,1]	<b>0,456</b>
Não	234	104,6 [48,5; 341,6]	

<sup>a</sup> Profissionais de Saúde em contacto direto com doentes COVID-19; <sup>b</sup> Patologias e tratamento farmacológico potencialmente associado a alterações na resposta imunitária; <sup>c</sup> Diagnóstico COVID-19 RT-qPCR positivo de março 2020 a novembro 2021 (SISLAB), antes e após o esquema vacinal primário completo; \*Valor de *p* considerado significativo abaixo de 0,05.

**Tabela 4.** Continuação: Determinação quantitativa de IgG anti- S/RBD e variação interindividual

Variáveis	n	Anti-S/RBD (BAU/mL) Mediana [IQR]	p*
<b>Esquema Vacinal</b>			
2x COMIRNATY®	314	79,9 [44,4; 148,4]	
1x COMIRNATY® PCR+	36	345,0 [189,1; 821,6]	
2x COMIRNATY® PCR+	40	783,2 [283,2; 2315,6]	
2 x Spikevax®	14	634,2 [202,0; 1221,0]	<b>&lt;0,001</b>
1x Spikevax® PCR+	8	1296,9 [606,7; 4576,2]	
2x VAXZEVRIA®	9	54,6 [15,7; 192,0]	
1x COVID-19 Vaccine Janssen®	6	76,6[15,6; 1276,8]	

\*Valor de *p* considerado significativo abaixo de 0,05.

A análise de correlação não paramétrica das variáveis contínuas com os níveis de anticorpos IgG anti- S/RBD apresenta-se na **Tabela 5**. A análise bivariada do coeficiente de correlação de *Spearman*, entre as variáveis contínuas: “número de dias após a vacinação completa” com os níveis de anticorpos anti-S/RBD; evidenciou uma correlação negativa ( $r=-0,294$ ;  $p=0,01$ ). Não se verificou correlação com os “dias após a infecção” ( $r = -0,196$ ;  $p=0,109$ ).

**Tabela 5.** Análise de correlação não paramétrica das variáveis contínuas com os níveis de anticorpos IgG anti- S/RBD

Variável	n	$r_s$	<i>p</i>
Dias após a vacinação completa	427	-0,294	<0,01*
<sup>a</sup> Dias após a infecção	68	-0,196	0,109

$r_s$ : Coeficiente de correlação de *Spearman*; \* Correlação significativa no nível 0,01 (bilateral);

<sup>a</sup> Informação apenas disponível para 68 participantes.

#### 4.5. Análise multivariada: Preditores da resposta humoral SARS-CoV-2

Tendo em conta os resultados da análise quantitativa (**Tabela 4**), foi considerado um MLG com distribuição gama e função log, tendo como variável dependente a concentração de anticorpos IgG anti-S/RBD e como potenciais preditores a idade, o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 com diagnóstico (RT-qPCR+) e o número de dias desde a vacinação até ao momento da colheita. O resultado da análise multivariada mostra que a idade e o diagnóstico molecular de infecção aparecem como preditores do nível de anticorpos IgG anti-S/RBD (**Tabela 6**). Para todos os grupos etários, à exceção

do grupo com idade igual ou superior a 60 anos, há uma redução significativa de cerca de 50% do nível de anti-S/RBD, comparativamente ao grupo mais jovem ( $\exp\beta=0,446$  IC95% entre 0,226 e 0,748) para o grupo 30-39 anos, ( $\exp\beta=0,422$  IC95% entre 0,233 e 0,765) para o grupo 40-49 anos e ( $\exp\beta=0,473$  IC95% entre 0,232 e 0,964) para o grupo 50-59 anos. Por sua vez, o diagnóstico molecular de infeção está positivamente associado aos valores de anti-S/RBD de tal forma que esses valores são quatro vezes mais elevados em participantes com diagnóstico de infeção SARS-COV-2 antes do esquema vacinal ( $\exp\beta=4,191$  IC95% entre 2,878 e 6,102) e onze vezes superior para os que tiveram diagnóstico de infeção após o esquema vacinal ( $\exp\beta=11,496$  IC95% entre 6,307 e 20,955).

**Tabela 6.** Modelo linear generalizado para análise de preditores de anticorpos IgG anti-S/RBD

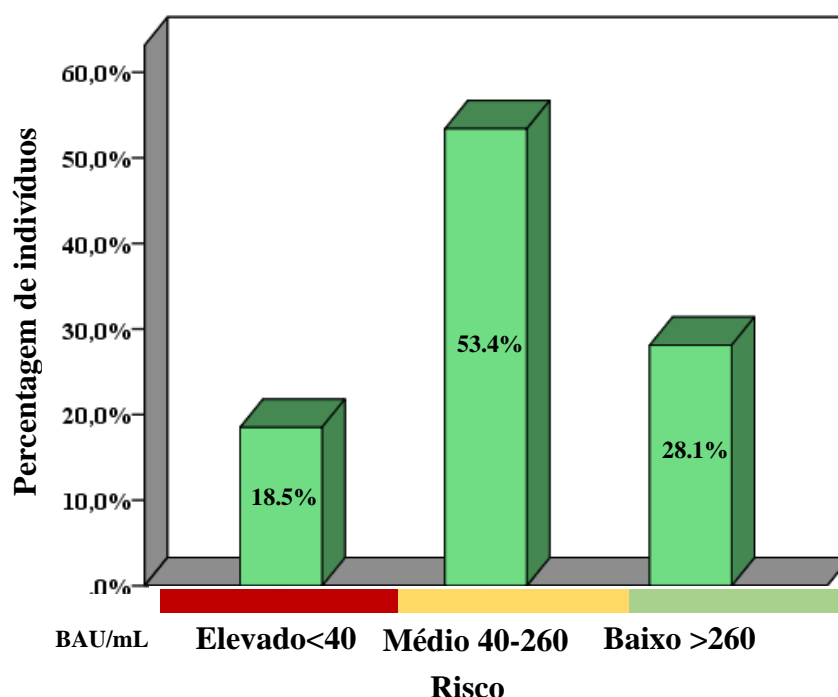
Variável Dependente: IgG anti-S/RBD (BAU/mL)			
Variáveis	Exponencial do coeficiente de regressão ( $\exp\beta$ ) ajustado <sup>b</sup>	IC 95%	<i>p</i> *
<b>Idade</b>			
20-29	1		
30-39	0,446	0,266 – 0,748	0,002
40-49	0,422	0,233 – 0,765	0,004
50-59	0,473	0,232 – 0,964	0,039
≥60	0,796	0,368 – 1,720	0,562
<b><sup>a</sup> COVID-19 (RT-qPCR+)</b>			
Não	1		
Sim, Antes da Vacina	4,191	2.878 - 6.102	<0.001
Sim, Após a Vacina	11,496	6.307 - 20.955	<0.001
<b>Dias após Vacinação</b>	0,999	0,996 - 1,001	0,243

<sup>a</sup> Diagnóstico Covid-19 RT-qPCR positivo de março 2020 a novembro 2021 (SISLAB), antes e após o esquema vacinal primário completo; <sup>b</sup> Ajustado para as restantes variáveis da tabela; \*Valor de *p* considerado significativo abaixo de 0,05.



#### 4.6. Níveis de anticorpos que conferem proteção

Foi realizada a avaliação dos resultados quantitativos para os anticorpos IgG anti-S/RBD de acordo com os intervalos estabelecidos pelo documento orientador da empresa Abbott (David et al., 2021) que apresenta recomendações para a interpretação de resultados dos testes serológicos, após a segunda dose da vacina (**Figura 8**).



**Figura 8.** Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti S/RBD e proteção contra a doença COVID-19 severa (David et al., 2021); Os valores dos intervalos referem-se a níveis de anticorpos IgG anti-S/RBD em BAU/mL; risco baixo (> 260 BAU/mL verde), risco medio (40 a 260 BAU/mL amarelo) e risco elevado (< 40 BAU/mL vermelho).

Nesta análise verificou-se que 18,5% (n=79) dos participantes apresentaram níveis de anticorpos IgG anti-S/RBD categorizados como tendo risco elevado (<40 BAU/mL) de serem afetados com sintomatologia grave de COVID-19. A maioria dos profissionais de saúde (n=228; 53,4%) foi classificada como tendo risco moderado (40-260 BAU/mL) e 120 (28,1%) como risco baixo (>260 BAU/mL).

## **CAPÍTULO V – DISCUSSÃO**

---

A disseminação do vírus SARS-CoV-2, ainda continua a impactar drasticamente a saúde pública das populações (Cohen & Burbelo, 2021). O conhecimento sobre a imunidade gerada pelas vacinas anti-COVID-19, encontra-se em constante evolução (Olariu et al., 2021). Dados sobre a persistência e efetividade da resposta imune de longo prazo são importantes para a compreensão da evolução global da dinâmica da doença COVID-19 e na implementação de políticas de saúde pública, especialmente porque surgem a cada instante novas variantes do vírus (Gallais et al., 2021).

### ***Incidência Cumulativa da Infecção SARS-CoV-2 entre os Profissionais de Saúde***

Profissionais de saúde, também chamados profissionais da “linha de frente” são considerados como grupo de risco à infecção por SARS-CoV-2, devido as funções que desempenham e o contacto próximo com doentes COVID-19 (Gómez-Ochoa et al., 2021; Guiomar et al., 2022). Fazer o levantamento epidemiológico para compreender a dinâmica da infecção entre os profissionais de saúde é extremamente importante para que se adotem medidas e se evite o agravamento da cadeia de transmissão nas unidades de saúde. Estudos realizados no início da pandemia mostraram uma elevada taxa de incidência relativamente à infecção entre os profissionais de saúde sugerindo que estes pudessem ser responsáveis por uma grande parte de diagnósticos positivos à COVID-19 na comunidade (Burrer et al., 2020; Wu & McGoogan, 2020).

Com base na percentagem de profissionais de saúde com teste RT-qPCR<sup>+</sup> para a COVID-19 determinou-se a incidência cumulativa da infecção no período anterior ao esquema vacinal primário e depois do esquema vacinal primário (**Tabela 1**). Não existindo relatos de reinfeção entre os participantes, durante o período em estudo. Verificou-se um valor de incidência cumulativa de 16.9% antes do esquema vacinal primário e 3.5% após o esquema vacinal primário completo. A diminuição da incidência cumulativa numa análise preliminar, poderá ser atribuída à vacinação. No entanto, esta interpretação tem de ser realizada com cautela. Apesar de todos os participantes terem respondido “sim” ou “não” para a questão “foi infetado”, e estes dados terem sido confirmados na plataforma informática hospitalar SISLAB, pode ter ocorrido que alguns participantes possam ter sido infetados sem que se tenha detetado a infecção por meios de diagnóstico molecular. Também não se pode descartar a hipótese que estas infeções

adquiridas no período anterior à vacinação possam ter desempenhado um papel protetor contribuído para diminuição dos casos COVID-19 no momento pós-vacina.

Presume-se que os profissionais de saúde, devido as suas funções e o contacto próximo a doentes infetados por SARS-CoV-2, estejam em alto risco de doença por COVID-19 (Baker et al., 2021). No entanto, vários estudos apresentam resultados contraditórios, alguns demonstraram que o contacto direto com doentes COVID-19 age como fator de risco (Gómez-Ochoa et al., 2021; Spilchuk et al., 2022) e outros não (Gholami et al., 2021; Leeds et al., 2020). Nem todos autores abordaram da mesma forma os fatores de predisposição ao risco ocupacional o que pode explicar a divergência nas conclusões obtidas. Outra explicação possível para a diminuição da incidência cumulativa no período pós-vacina é o facto dos profissionais de saúde, com o decorrer da pandemia, terem de aplicar diretrizes cada vez mais rígidas para uso de equipamentos de proteção individual (EPI), podendo este fator ter contribuído, limitando a exposição ao risco ocupacional. Esta explicação têm vindo a ser corroborada por diversos autores (Alishaq et al., 2021; Guiomar et al., 2022).

Da revisão bibliográfica emergem alguns fatores que parecem predispor os indivíduos a um maior risco de infeção e severidade da doença tais como o género, idade, contacto com utentes COVID-19, patologias, IMC e hábitos tabágicos. Vários estudos têm demonstrado que a idade mais avançada e o género masculino estão associados a um maior risco de infeção por SARS-CoV-2 (Meister et al., 2022; Parohan et al., 2021; Pijls et al., 2021). Uma explicação possível às disparidades encontradas entre género são as diferenças observadas na expressão da ACE2 e níveis hormonais (Salah & Mehta, 2021; Taslem Mourosi et al., 2022; Viveiros et al., 2021). Um estudo epidemiológico realizado na Croácia (Meister et al., 2022) refere que a idade e o género não estão associados a uma maior incidência de infeção por SARS-CoV-2 mas sim ao desenvolvimento de doença mais severa. Múltiplas condições de saúde crónicas ou comorbidades, demonstraram ter um impacto no risco acrescido de infeção e doença COVID-19 (as principais doenças relatadas: doenças cardiovasculares, asma, hipertensão arterial, diabetes, doenças imunossupressoras, doenças inflamatórias) (Bayram et al., 2021; Meister et al., 2022; Parohan et al., 2021; Uysal et al., 2022; Zhao et al., 2020). Verifica-se que a expressão de ACE2 pode estar aumentada nas células epiteliais alveolares devido a hábitos tabágicos, e no tecido adiposo em situações de obesidade

(Engin et al., 2020). O aumento da expressão da ACE2 leva a uma maior predisposição para a infecção por SARS-CoV-2 (Engin et al., 2020; Patanavanich & Glantz, 2020; Sattar & Valabhji, 2021; Zhao et al., 2020). Todos estes fatores foram analisados nesta amostra, no entanto, não apresentaram associação com significância estatística para incidência cumulativa da infecção (**Tabela 2**).

### ***Determinação Qualitativa dos Anticorpos IgG anti-N e anti-S/RBD: Reatividade***

Ensaio sorológicos para anticorpos COVID-19 são importantes para avaliar respostas à vacinação ou infecção de forma a monitorizar a efetividade da vacina na população. Os ensaios aplicados neste estudo visaram a proteína N e S do vírus SARS-CoV-2, de forma a avaliar a reatividade aos anticorpos IgG anti-N e IgG anti-S/RBD. A proteína S é principal alvo utilizado no desenvolvimento de vacinas, uma vez que o RBD, na subunidade S1 do SARS-CoV-2, é considerado o principal alvo para anticorpos de ligação e neutralização (Ghaffari et al., 2020; Koch et al., 2021). A proteína S não só está relacionada com a vacinação, mas também com a infecção (Guiomar et al., 2022; Wadhwa et al., 2021). Já a proteína N está relacionada com a infecção. De forma a poder distinguir uma resposta vacinal de uma infecção, vários estudos têm optado por usar ambos os ensaios para conseguir fazer essa diferenciação (Wadhwa et al., 2021).

Se observarmos os resultados da reatividade de anticorpos IgG anti-S/RBD obtidos a partir dos testes serológicos aplicados neste estudo (Abbott), verificamos que 98,8% (n= 422; **Tabela 3**) dos profissionais de saúde, obteve reatividade para este anticorpo IgG anti-S/RBD. O facto de quase a totalidade da amostra (98,8%) ter este anticorpo presente poderá ser indicativo de reação imunológica à vacinação, pressupondo que a partir dessa reação contribuirá para papel protetor em futuros contactos com o vírus (Dimeglio et al., 2022; Kadkhoda, 2021). Este resultado pode também ser uma explicação para a diminuição do risco de infecção na população em estudo. Para indivíduos com RT-qPCR<sup>+</sup>, era esperado que estes demonstrassem reatividade ao IgG anti-N, contudo, apenas foi detetável para 26 das 88 pessoas com RT-qPCR<sup>+</sup>, o que se pode justificar com o declínio deste anticorpo ao longo do tempo, mais rápido do que do IgG anti-S/RBD, desde a infecção tornando-se indetetável, como já foi evidenciado (Gallais et al., 2021; Wang et al., 2021). O IgG anti-N também apresentou reatividade em 4,7% dos indivíduos com RT-qPCR<sup>-</sup> negativo, indicando a existência de possíveis infecções não detetadas a nível

molecular, o que revela mais uma vez a importância desta abordagem, pois o *serus status* é importante para determinar que medidas seguir, como se verificou na decisão do número de doses da vacina a inocular tendo em conta histórico de infeção (Favresse et al., 2021). É ainda importante considerar que, neste estudo, 1,2% (n=5; **Tabela 3**) dos profissionais de saúde não mostraram qualquer resposta aos anticorpos anti-SARS-CoV2, ou seja, não tiveram imunidade humoral após a vacinação, e estes casos devem ser avaliados individualmente para compreender quais os fatores que podem estar envolvidos para causar uma possível falha na resposta imunológica à vacina. A análise qualitativa conjunta destes dois anticorpos permite avaliar a resposta à infeção e à vacinação e ainda detetar situações anómalas do *status* imunitário de cada indivíduo, como por exemplo, falha na seroconversão.

#### ***Determinação Quantitativa dos Anticorpos IgG anti-S/RBD: Variação Interindividual***

Diferentes variáveis podem influenciar a qualidade e duração da resposta humoral pós-infeção e pós-vacinação, sendo fundamental analisar em que medida podem condicionar a variação interindividual (Uysal et al., 2022; Zimmermann & Curtis, 2019). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a idade, a infeção por SARS-CoV-2 e o esquema vacinal são fatores que condicionam a resposta humoral ao vírus SARS-COV-2.

Os resultados obtidos nesta amostra, demonstraram que indivíduos com idades mais jovens, especialmente aqueles que se encontravam na faixa do 20 aos 29 anos de idade tiveram títulos de IgG anti-S/RBD mais elevados que os restantes (**Tabela 4**). Outros estudos semelhantes baseados numa amostra de profissionais de saúde com esquema vacinal completo, obtiveram os mesmos resultados (Tré-Hardy et al., 2021; Vilas Boas et al., 2021; Wolszczak-Biedrzycka et al., 2021). No entanto, a idade nem sempre aparece associada a uma resposta humoral diferente, em diversos estudos não foi identificada diferença significativa entre grupos etários (Assaid et al., 2022; Guiomar et al., 2022; Morgiel et al., 2022). O tamanho limitado da amostra, pode ser uma explicação para a disparidade encontrada, impedindo uma análise mais robusta. Pode-se observar que para esta variável com a aplicação do MLG (**Tabela 6**), os níveis de anticorpos também diminuem com o aumento da idade, relativamente à faixa etária mais jovem e com exceção da faixa etária mais velha (>60 anos), que não apresenta uma diferença

significativa. Esta variável mantém-se assim com significância após o modelo (MLG; **Tabela 6**), mostrando-se um preditor do nível de anticorpos para este estudo.

Um dos fatores associados a uma maior resposta humoral foi a presença de infecção por SARS-CoV-2, quer esta tenha ocorrido antes do esquema vacinal primário como depois (**Tabela 4**). Destacando que a resposta humoral foi substancialmente mais forte em indivíduos que foram infetados depois do esquema da vacinação completa. Esta é uma conclusão recorrente na literatura científica (Favresse et al., 2021; Morgiel et al., 2022; Wolszczak-Biedrzycka et al., 2021). O facto de se observar uma resposta imunológica ao SARS-CoV-2 mais robusta após o esquema vacinal pode ser explicado quer pela presença de imunidade híbrida (infecção prévia e simultaneamente a resposta à vacinação) quer pelo tempo que decorreu da infecção até a análise. Numa situação de imunidade híbrida, a imunização após infecção poder induzir a uma resposta imune direcionada contra vários antígenos do vírus e não apenas contra a proteína S (alvo das quatro vacinas administradas), como no caso de indivíduos imunizados somente pela vacinação (Morgiel et al., 2022). O MLG (**Tabela 6**) reforça esta significância na presença de RT-qPCR<sup>+</sup>, onde após a linearização a infecção continuou como um preditor para o nível de anticorpos S/RBD, verificando-se um contributo muito maior quando esta infecção ocorre após a vacinação. Assim, os resultados da análise de regressão multivariada corroboram o que tem vindo a ser publicado, os participantes que foram infetados apresentam uma resposta humoral mais robusta sendo que naqueles que foram infetados há menos tempo, o valor é superior. Após a vacinação, a infecção incrementa em 11 vezes o nível de anticorpos S/RBD, enquanto a infecção antes da vacinação apenas incrementa 4 vezes. Esta tendência tem vindo a ser corroborada na literatura, os níveis de anticorpos vão decaindo com o tempo e associados à infecção diminuem mais lentamente (Decru et al., 2022; Homan et al., 2022; Hosseinian et al., 2022; Oliveira-Silva et al., 2022a, 2022b).

A pandemia ligada ao vírus SARS-CoV-2 levou a um esforço global no desenvolvimento de diversas vacinas COVID-19 em uma escala e ritmo sem precedentes. Sendo que, os atuais regimes de vacinação COVID-19 compreendem diversas marcas/tipo de vacinas, e intervalos de dosagem (Wang et al., 2022). Ao analisarmos o esquema vacinal (**Tabela 4**) é necessário ter em conta alguns fatores importantes tais como: a inoculação (efetuada mediante tipo/marca de vacina disponível no momento), o esquema vacinal adotado, infecção por SARS-CoV-2, dias desde a infecção

até à vacinação, bem como dias da vacinação até à análise serológica. Apesar desta análise sobre o esquema vacinal, existirem alguns elementos confundidores que impossibilitam retirar conclusões precisas sobre a quantificação de anticorpos IgG anti-S/RBD derivados da resposta humoral. Podemos observar que indivíduos com esquemas vacinais com episódio de infeção por SARS-CoV-2 desenvolveram uma resposta imunológica de anticorpos IgG anti-S/RBD superior face a indivíduos com esquemas vacinais sem episódio de infeção, demonstrando que o esquema vacinal é dependente da infeção, tendo estas variáveis uma forte ligação. O fator que podemos destacar, é que independentemente do tipo/marca de vacina, a intensidade da resposta humoral após vacinação foi mais robusta em indivíduos com infeção por SARS-CoV-2. De salientar que existem poucas investigações que abordem a resposta humoral relacionando-a com os vários tipos/marcas de vacina, bem como com o esquema vacinação adotado.

Diferentes estudos têm evidenciado como preditores da variação interindividual nos níveis de anticorpos anti-S/RBD o género, patologias associadas, IMC, hábitos tabágicos, contacto direto com doentes COVID-19 e sintomas após a infeção, no entanto na amostra deste estudo não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos categorizados. A revisão bibliográfica da literatura, tem demonstrado que existe diminuição mais acentuada dos níveis de anticorpos no sexo masculino (Gallais et al., 2021; Levin et al., 2021; Naaber et al., 2021; Uysal et al., 2022). Um estudo comparou profissionais com e sem contacto direto com doentes COVID-19, observando-se que o nível de anticorpos IgG anti-S/RBD foi superior em profissionais com contacto direto (Korth et al., 2020). Relativamente às patologias, em indivíduos imunocomprometidos e com doenças inflamatórias, foi observado que os títulos de anticorpos IgG anti-S/RBD nessas populações tendem a ser mais tardias e em menor proporção (Hadjadj et al., 2022; Levin et al., 2021; Li et al., 2022). Neste estudo, não se observaram diferenças significativas para o grupo afetado com doenças inflamatórias nem para o grupo afetado com doenças imunossupressoras. Este resultado pode dever-se, não só ao facto da amostra ser muito reduzida para estas categorizações, mas também à presença de diferentes esquemas terapêuticos a que os participantes poderiam estar sujeitos (Abreu, 1997; De Greef et al., 2021; Greenberger et al., 2021; Li et al., 2022). Nesta análise não se observaram diferenças significativas relativamente ao IMC, contudo alguns estudos concluíram que o título de anticorpos foi menor nos participantes com IMC elevado



( $\geq 30.0$ ) (Gallais et al., 2021; Uysal et al., 2022), sendo expectável, uma vez que a obesidade de certo modo contribui para um baixo desempenho imunológico (Milner & Beck, 2012); e outros observaram um aumento dos níveis de anticorpos em participantes obesos (Levin et al., 2021). Este aumento verificado para o IMC pode ser justificado pelo facto de a população obesa ser um grupo com risco acrescido de infeção e de doença severa COVID-19, sendo que a doença severa por consequência confere uma resposta humoral mais robusta ao SARS-CoV-2 (De Greef et al., 2021; Havervall, Jernbom Falk, et al., 2022; Legros et al., 2021). Indivíduos com sintomatologia mais grave numa situação de infeção, tendem a ter títulos de anticorpos mais elevados do que aqueles com sintomatologia leve a moderada; e aqueles com infeções assintomáticas induzem títulos de anticorpos ainda mais reduzidos (De Greef et al., 2021; Havervall, Jernbom Falk, et al., 2022; Legros et al., 2021). Quanto a indivíduos com hábitos tabágicos, é descrito que os níveis de anticorpos SARS-CoV-2 são menores face a indivíduos não fumadores (Gudbjartsson et al., 2020; Uysal et al., 2022).

A hipótese de diminuição da imunidade humoral levantou muitas preocupações sobre a proteção dos anticorpos de longo prazo contra a reinfeção e, por extensão, a durabilidade da proteção conferida pelas vacinas anti-COVID-19 (Gallais et al., 2021; Guiomar et al., 2022). A análise de correlação entre o número de dias após a vacinação e/ou infeção e o título de anticorpos IgG anti-S/RBD (**Tabela 5**) evidenciou uma redução do nível de anticorpos à medida que o número de dias aumenta após a vacinação completa, corroborando outros estudos semelhantes (Dobaño et al., 2021; Gallais et al., 2021). Em relação aos dias após a infeção não se observou nenhuma correlação com o título de anticorpos. O tempo decorrido desde a vacinação até à análise, “Dias após vacinação completa”, foi uma variável inserida no MLG (**Tabela 6**), mas não se mostrou preditor da concentração de anticorpos anti-S/RBD ao contrário do que foi observado na análise bivariada (*correlação de spearman*). De acordo com o descrito na literatura, seria de esperar uma diminuição dos títulos de anticorpos com o tempo decorrido após a vacinação, contudo, esta perde significância com o modelo ajustado semelhantes (Dobaño et al., 2021; Gallais et al., 2021; Levin et al., 2021; Olariu et al., 2021). A perda de significância pode ser justificada pelo facto de os indivíduos com infeção serem vacinados mais tarde, logo o tempo decorrido após a vacinação é condicionado pela presença de infeção. Esta situação cria um viés podendo ser responsável pela diferença

observada nas duas análises efetuadas, bivariada e MLG. A infecção, sendo um preditor muito forte, confunde esta variável, perdendo esta qualquer efeito no nível de anticorpos obtido, após aplicação do modelo.

Neste trabalho, após aplicação do MLG (**Tabela 6**), apenas a idade e a presença de infecção por SAR-CoV-2, demonstraram ser preditores na resposta humoral dos participantes. Embora outros estudos refiram mais variáveis como preditores da resposta humoral, as restantes variáveis avaliadas neste estudo não apresentaram significância na análise bivariada, não sendo incluídas no modelo.

### ***Níveis de Anticorpos que Confere Proteção***

Para a comunidade científica, devido as disparidades observadas na quantificação de anticorpos, pela utilização de diferentes testes e equipamentos, houve a necessidade de se desenvolverem padrões e selecionar as unidades em que os resultados deveriam ser apresentados. Em apoio ao desenvolvimento e harmonização de ensaios serológicos para anticorpos COVID-19 usados para avaliar a resposta humoral à vacinação ou infecção, uma padronização foi proposta sob o código 20/136 em dezembro de 2020. Com base nessa padronização, para ensaios de ligação, uma unidade arbitrária de 1.000 unidades de anticorpos de ligação (BAU/mL) pode ser usada para auxiliar na comparação de ensaios que detetam a mesma classe de imunoglobulinas anti SARS-CoV-2. Essa comparação é particularmente importante para a identificação de correlatos de proteção contra a COVID-19, contudo, como já referido, a correlação da proteção contra a SARS-CoV-2 ainda não foi bem definida, sendo importante para uma correta comparação o uso de um padrão internacional (Dimeglio et al., 2022; Kadkhoda, 2021; Kristiansen et al., 2021b).

A infecção e a vacinação contra SARS-CoV-2 induzem uma resposta de anticorpos contra glicoproteína viral S do vírus SARS-CoV-2. A correlação observada por vários estudos entre a concentração de anticorpos de ligação contra a proteína S e a proteção contra a COVID-19 severa, indica que esta pode ser usada como um marcador para prever a probabilidade de um indivíduo estar protegido da doença (Decru et al., 2022; Havervall, Ng, et al., 2022). Os consultores da empresa Abbott elaboraram um guia para maximizar os benefícios do teste serológico e avaliar a proteção conferida pela imunidade humoral em indivíduos mais vulneráveis e estabeleceram alguns intervalos (BAU/mL) com as respectivas recomendações (David et al., 2021). Segundo os autores do guia, os indivíduos

imunocomprometidos, devido à sua condição, deveriam realizar teste serológico quantitativo (IgG II, IgG anti-S/RBD, Abbott) na 3ª ou 4ª semana após a 2ª dose de vacina, para a titulação de anticorpos (David et al., 2021). Considerando que o valor dos anticorpos decai com o tempo (Eyran et al., 2022), comparativamente aos autores do guia, que avaliaram a concentração de anticorpos na 3ª ou 4ª semana, 53,4% dos participantes deste estudo em média  $8,2 \pm 2,3$  meses depois da 2ª vacina, mantiveram títulos de anticorpos IgG anti-S/RBD, o que é interpretado como uma proteção mediana contra doença COVID-19 severa (Risco médio; **Figura 8**). Caso esta análise fosse efetuada no mesmo período de tempo elaborada pelo guia (3ª ou 4ª semana), estes indivíduos teriam uma concentração de anticorpos muito superior. Podendo inferir que muitos destes profissionais de saúde da ULSNE (53,4%) possuíam alguma proteção contra a doença COVID-19.

Mesmo com a definição dos padrões pela OMS, inferir sobre a proteção de cada indivíduo com base na quantificação de anticorpos continua a ser difícil (Boan et al., 2022; Kristiansen et al., 2021a; Zhu et al., 2022). Com a vaga da variante Ómicron, muitas pessoas vacinadas foram infetadas. Diferentes grupos de investigação tentam perceber se há perda da capacidade de neutralização do soro nos indivíduos vacinados em relação a esta nova variante (Liu et al., 2022) o que parece confirmar-se (Pulliam 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, será muito difícil estabelecer esta relação. Contudo, esta avaliação tem de continuar para inferir a necessidade das doses do reforço da vacina. A inoculação contínua pode levar a vários problemas nomeadamente a diminuição dos níveis de linfoblastos e por sua vez a diminuição dos níveis de anticorpos, originando “tolerância” à vacina e aumento da probabilidade de efeitos colaterais como miocardite e outras doenças inflamatórias (Samanovic et al., 2021).

### ***Limitações do estudo***

Embora este estudo forneça dados importantes para a comunidade científica sobre a resposta imunitária à COVID-19 é importante referir que o mesmo apresenta algumas limitações. Uma delas, relaciona-se com o fato de não ter sido possível a realização de colheita de soro para análise serológica antes de os participantes terem sido vacinados (em dezembro 2020). Esta análise teria permitido retirar algumas elações sobre o verdadeiro peso da vacinação na resposta humoral.

Não foram efetuados ensaios de neutralização nem testes para avaliação da imunidade celular no soro dos participantes. Os testes de neutralização teriam permitido aferir a capacidade de neutralização do soro dos participantes e comparar ambas metodologias, de forma a verificar a conformidade dos resultados obtidos. Como já foi referido anteriormente, vários estudos demonstraram que existe uma elevada correlação dos níveis de anticorpos anti-S/RBD com os testes de neutralização (Assaid et al., 2022; Cristiano et al., 2022; Giavarina & Carta, 2021; Padoan et al., 2022; Tiwari et al., 2021). Também não foram realizados testes para aferir a imunidade celular na COVID-19 esta apresenta-se como um importante ramo de defesa na proteção contra a infeção e doença severa (Li et al., 2022). Não foi analisada a especificidade deste método de quantificação de anticorpos tendo em conta a variante de preocupação (VOCs) *Delta*, uma diminuição nos títulos de anticorpos pode ser esperada já que os anticorpos utilizados nos testes serológicos foram “desenhados” para a estirpe selvagem do SARS-CoV-2, identificada pela primeira vez.

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

---

A vacinação continua a ser uma medida preventiva fundamental para reduzir a carga da doença na COVID-19 e amenizar futuros surtos. O conhecimento que hoje a comunidade científica detém sobre a imunidade no período pós-vacinação, é resultante de várias pesquisas sobre a quantificação de anticorpos específicos em contexto de ensaios clínicos e estudos epidemiológicos. Os dados sobre a cinética da imunidade humoral e a efetividade da vacina são valiosos para as entidades de saúde, no sentido de se poderem implementar medidas para reduzir a mortalidade, sintomatologia grave e transmissão e incluir novas terapêuticas ou doses adicionais de reforço.

A incidência cumulativa de infeção por SARS-CoV-2 diminuiu no período após a vacinação primária completa. A avaliação da imunidade humoral revelou que a maior parte dos profissionais de saúde da ULSNE apresentou reatividade aos anticorpos IgG anti-S/RBD permitindo concluir que houve resposta humoral à vacina. Verificou-se que os principais preditores da resposta humoral neste estudo é a presença de infeção e a idade. À semelhança do que tem vindo a ser publicado, os indivíduos que foram vacinados e estiveram infetados apresentam níveis de anticorpos mais elevados. Até a data do ensaio serológico, 53,4% apresentavam proteção mediana de doença severa COVID-19.

A investigação no qual este estudo está inserido terá continuidade, com a realização de uma nova análise serológica antes da toma da segunda dose de reforço (4<sup>a</sup> dose) da vacina COVID-19. Tendo em vista a obtenção de resultados comparativos em termos da evolução da imunidade face à doença. Todos estes profissionais de saúde serão novamente inquiridos sobre o seu estado clínico e infeção por SARS-Cov-2 relativamente ao período de novembro de 2021 até outubro de 2022.

De acordo com os dados epidemiológicos a nível nacional e internacional, é expectável que, no período pós-colheita realizada no contexto deste trabalho (novembro de 2021), coincidente com a vaga de infeções atribuída à variante VOC Delta e seguindo-se a vaga Ómicron, muitos participantes deste estudo tenham sido infetados contribuindo para aumentar a incidência da infeção nesta amostra.

A análise serológica no período pós-vacinação na COVID-19 é um tópico de investigação muito atual e de grande relevância para a comunidade científica que se dedica aos aspetos epidemiológicos da COVID-19 e à efetividade da vacina, no entanto, continuam a ser necessários mais estudos para compreender a cinética desta resposta.

Este estudo serológico foi efetuado em paralelo com a avaliação da imunidade humoral SARS-COV-2 em idosos antes da toma da primeira dose de reforço da vacina contra a COVID-19, aplicando a mesma metodologia e objetivos de estudo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



- Abbott Laboratories. (2022a). *Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Instructions for Use*.
- Abbott Laboratories. (2022b). *Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG Quant Reagent Instructions for Use*.
- Abreu, M. T. de. (1997). Antiinflamatórios e imunossupressores. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 60(4). <https://doi.org/10.5935/0004-2749.19970049>
- 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>
- Alishaq, M., Jeremijenko, A., Al-Kanaani, Z., Nafady-Hego, H., Jboor, D. H., Saba, R., Al-Ajmi, J., Alansari, N. A., Thomas, A. G., Fareh, S. B., Vinoy, S., Nooh, M., Alanzi, N., Abou-Samra, A. B., & Butt, A. A. (2021). Prevalence and risk factors for SARS-CoV-2 infection and seroprevalence among clinical and non-clinical staff in a national healthcare system. *PLoS ONE*, 16(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0257845>
- Anka, A. U., Tahir, M. I., Abubakar, S. D., Alsabbagh, M., Zian, Z., Hamedifar, H., Sabzevari, A., & Azizi, G. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(4). <https://doi.org/10.1111/SJI.12998>
- Arnold, K. F., Davies, V., De Kamps, M., Tennant, P. W. G., Mbotwa, J., & Gilthorpe, M. S. (2021). Reflection on modern methods: generalized linear models for prognosis and intervention—theory, practice and implications for machine learning. *International Journal of Epidemiology*, 49(6), 2074–2082. <https://doi.org/10.1093/IJE/DYAA049>
- Assaid, N., Arich, S., Charoute, H., Akarid, K., Ezzikouri, S., Maaroufi, A., & Sarih, M. (2022). Anti-SARS-CoV-2 Antibody Responses 5 Months Post Complete Vaccination of Moroccan Healthcare Workers. *Vaccines*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines10030465>
- Baker, J. M., Nelson, K. N., Overton, E., Lopman, B. A., Lash, T. L., Photakis, M., Jacob,

- J. T., Roback, J. D., Fridkin, S. K., & Steinberg, J. P. (2021). Quantification of occupational and community risk factors for sars-cov-2 seropositivity among health care workers in a large U.S. health care system. *Annals of Internal Medicine*, *174*(5), 649–654. [https://doi.org/10.7326/M20-7145/SUPPL\\_FILE/M20-7145\\_SUPPLEMENT.PDF](https://doi.org/10.7326/M20-7145/SUPPL_FILE/M20-7145_SUPPLEMENT.PDF)
- Bayram, A., Demirbakan, H., Günel Karadeniz, P., Erdoğan, M., & Koçer, I. (2021). Quantitation of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein after two doses of CoronaVac in healthcare workers. *Journal of Medical Virology*, *93*(9), 5560–5567. <https://doi.org/10.1002/JMV.27098>
- Bentley, E. M., Atkinson, E., Rigsby, P., Elsley, W., Bernasconi, V., Kristiansen, P., Harvala, H., Turtle, L. C., Dobson, S., Wendel, S., Anderson, R., Kempster, S., Duran, J., Padley, D., Almond, N., Rose, N. J., Page, M., & Mattiuzzo, G. (2022). *Establishment of the 2 nd WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin and Reference Panel for antibodies to SARS-CoV-2 variants of concern.*
- Bio-Rad, & Laboratories, I. (2022). *Platelia anti-SARS-CoV-2 S IgG Quant.* [https://www.bio-rad.com/sites/default/files/2022-04/PF409\\_platelia-igg-quant\\_brochure-ous\\_jan2022.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/2022-04/PF409_platelia-igg-quant_brochure-ous_jan2022.pdf)
- 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), 344–350. <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>
- Burrer, S. L., de Perio, M. A., Hughes, M. M., Kuhar, D. T., Luckhaupt, S. E., McDaniel, C. J., Porter, R. M., Silk, B., Stuckey, M. J., & Walters, M. (2020). Characteristics of Health Care Personnel with COVID-19 — United States, February 12–April 9, 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *69*(15), 477–481. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6915e6>

- Calina, D., Docea, A. O., Petrakis, D., Egorov, A. M., Ishmukhametov, A. A., Gabibov, A. G., Shtilman, M. I., Kostoff, R., Carvalho, F., Vinceti, M., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. (2020). Towards effective COVID-19 vaccines: Updates, perspectives and challenges (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 3. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2020.4596>
- Carrillo, J., Izquierdo-Useros, N., Ávila-Nieto, C., Pradenas, E., Clotet, B., & Blanco, J. (2021). Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.108>
- Carvalho, A. C., & Paiva, P. H. M. (2021). SARS-COV-2: fatores associados à suscetibilidade à forma grave da covid-19. *Archives of Health*, 2(3), 314–331. <https://doi.org/10.46919/archv2n3-010>
- Casella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150360>
- CDC. (2021). Symptoms of COVID-19 | CDC. In *Centre for Disease Prevention and Control (CDC)*. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
- 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. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1866>
- Comissão Europeia. (2022). *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)
- 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 (Orlando, Fla.)*, 234, 108918. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108918>
- 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 Donno, A., Lobreglio, G., Panico, A., Grassi, T., Bagordo, F., Bozzetti, M. P., Massari, S., Siculella, L., Damiano, F., Guerra, F., Greco, M., Chicone, M., Lazzari, R., & Alifano, P. (2021). IgM and IgG Profiles Reveal Peculiar Features of Humoral Immunity Response to SARS-CoV-2 Infection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1318. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031318>
- De Greef, J., Scohy, A., Zech, F., Aboubakar, F., Pilette, C., Gerard, L., Pothen, L., Yildiz, H., Belkhir, L., & Yombi, J. C. (2021). Determinants of IgG antibodies kinetics after severe and critical COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(9), 5416–5424. <https://doi.org/10.1002/jmv.27059>
- Decru, B., Van Elslande, J., Steels, S., Van Pottelbergh, G., Godderis, L., Van Holm, B., Bossuyt, X., Van Weyenbergh, J., Maes, P., & Vermeersch, P. (2022). IgG Anti-Spike Antibodies and Surrogate Neutralizing Antibody Levels Decline Faster 3 to 10 Months After BNT162b2 Vaccination Than After SARS-CoV-2 Infection in Healthcare Workers. *Frontiers in Immunology*, 13(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.909910>
- Dimeglio, C., Herin, F., Martin-Blondel, G., Miedougé, M., & Izopet, J. (2022). Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection. *Journal of Infection*, 84(2), 248–288. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.09.013>
- Direção Geral de Saúde. (2020). *COVID-19 Relatório n°24 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>
- Dobaño, C., Ramírez-Morros, A., Alonso, S., Vidal-Alaball, J., Ruiz-Olalla, G., Vidal, M., Rubio, R., Cascant, E., Parras, D., Rodrigo Melero, N., Serra, P., Carolis, C.,

- Santamaria, P., Forcada, A., Mendioroz, J., Aguilar, R., Moncunill, G., & Ruiz-Comellas, A. (2021). Persistence and baseline determinants of seropositivity and reinfection rates in health care workers up to 12.5 months after COVID-19. *BMC Medicine*, *19*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12916-021-02032-2/TABLES/2>
- Engin, A. B., Engin, E. D., & Engin, A. (2020). Two important controversial risk factors in SARS-CoV-2 infection: Obesity and smoking. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *78*, 103411. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103411>
- 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>
- Eyran, T., Vaisman-Mentesh, A., Taussig, D., Dror, Y., Aizik, L., Kigel, A., Rosenstein, S., Bahar, Y., Ini, D., Tur-Kaspa, R., Kournos, T., Marcoviciu, D., Dicker, D., & Wine, Y. (2022). Longitudinal kinetics of RBD+ antibodies in COVID-19 recovered patients over 14 months. *PLoS Pathogens*, *18*(6), e1010569. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010569>
- Favresse, J., Bayart, J.-L., Mullier, F., Dogné, J.-M., Closset, M., & Douxfils, J. (2021). Early antibody response in health-care professionals after two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine (BNT162b2). *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *27*(9), 1351.e5-1351.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.004>
- Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., & Langlois, M.-A. (2020). Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, *11*, 3382. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.610688>
- 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>
- 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>
- Gholami, M., Fawad, I., Shadan, S., Rowaiee, R., Ghanem, H. A., Hassan Khamis, A., & Ho, S. B. (2021). COVID-19 and healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, *104*, 335–346. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2021.01.013>
- Giavarina, D., & Carta, M. (2021). Improvements and limits of anti SARS-CoV-2 antibodies assays by WHO (NIBSC 20/136) standardization. *Diagnosis (Berlin, Germany)*, *9*(2), 274–279. <https://doi.org/10.1515/dx-2021-0126>
- Gómez-Ochoa, S. A., Franco, O. H., Rojas, L. Z., Raguindin, P. F., Roa-Díaz, Z. M., Wyssmann, B. M., Guevara, S. L. R., Echeverría, L. E., Glisic, M., & Muka, T. (2021). COVID-19 in Health-Care Workers: A Living Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence, Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcomes. *American Journal of Epidemiology*, *190*(1), 161–175. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa191>
- Greenberger, L. M., Saltzman, L. A., Senefeld, J. W., Johnson, P. W., DeGennaro, L. J., & Nichols, G. L. (2021). Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell*, *39*(8), 1031–1033. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.07.012>
- Gudbjartsson, D. F., Norddahl, G. L., Melsted, P., Gunnarsdottir, K., Holm, H., Eythorsson, E., Arnthorsson, A. O., Helgason, D., Bjarnadottir, K., Ingvarsson, R. F., Thorsteinsdottir, B., Kristjansdottir, S., Birgisdottir, K., Kristinsdottir, A. M.,

- Sigurðsson, M. I., Arnadóttir, G. A., Ivarsdóttir, E. V., Andrésdóttir, M., Jonsson, F., ... Stefánsson, K. (2020). Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *The New England Journal of Medicine*, 383(18), 1724–1734. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026116>
- 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. (2022). Monitoring of SARS-CoV-2 Specific Antibodies after Vaccination. *Vaccines*, 10(2), 154. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020154>
- Hadjadj, J., Planas, D., Ouedrani, A., Buffier, S., Delage, L., Nguyen, Y., Bruel, T., Stolzenberg, M.-C., Staropoli, I., Ermak, N., Macraigne, L., Morbieu, C., Henriquez, S., Veyer, D., Péré, H., Casadevall, M., Mouthon, L., Rieux-Laucat, F., Chatenoud, L., ... Terrier, B. (2022). Immunogenicity of BNT162b2 vaccine against the Alpha and Delta variants in immunocompromised patients with systemic inflammatory diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 81(5), 720–728. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221508>
- Han, L., Ran, J., Mak, Y.-W., Suen, L. K.-P., Lee, P. H., Peiris, J. S. M., & Yang, L. (2019). Smoking and Influenza-associated Morbidity and Mortality. *Epidemiology*, 30(3), 405–417. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000984>
- Harritshøj, 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), 2596–2616. <https://doi.org/10.1128/JCM.02596-20>
- Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(3), 549. <https://doi.org/10.3906/SAG-2004-127>
- Havervall, S., Jernbom Falk, A., Klingström, J., Ng, H., Greilert-Norin, N., Gabrielsson, L., Salomonsson, A.-C., Isaksson, E., Rudberg, A.-S., Hellström, C., Andersson, E., Olofsson, J., Skoglund, L., Yousef, J., Pin, E., Christ, W., Olausson, M., Hedhammar, M., Tegel, H., ... Thålin, C. (2022). SARS-CoV-2 induces a durable

- and antigen specific humoral immunity after asymptomatic to mild COVID-19 infection. *PLOS ONE*, 17(1), e0262169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262169>
- Havervall, S., Ng, H., Jernbom Falk, A., Greilert-Norin, N., Månberg, A., Marking, U., Laurén, I., Gabrielsson, L., Salomonsson, A., Aguilera, K., Kihlgren, M., Månsson, M., Rosell, A., Hellström, C., Andersson, E., Olofsson, J., Skoglund, L., Yousef, J., Pin, E., ... Thålin, C. (2022). Robust humoral and cellular immune responses and low risk for reinfection at least 8 months following asymptomatic to mild COVID-19. *Journal of Internal Medicine*, 291(1), 72–80. <https://doi.org/10.1111/joim.13387>
- 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. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
- Homan, T., Fortunato, F., Corso, G., Lopalco, P. L., Prato, R., & Martinelli, D. (2022). Effect of Previous SARS-CoV-2 Infection on Antibody Response to a Single Immunization with the Pfizer BNT162b mRNA Vaccine Among Healthcare Workers in Foggia, Italy. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(1), 607–615. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00582-9>
- Hosseinian, S., Powers, K., Vasudev, M., Palma, A. M., de Assis, R., Jain, A., Horvath, P., Birring, P. S., Andary, R., Au, C., Chin, B., Khalil, G., Ventura, J., Luu, M. K., Figueroa, C., Obiero, J. M., Silzel, E., Nakajima, R., Gombrich, W. T., ... Specimen Collection Group. (2022). Persistence of SARS-CoV-2 Antibodies in Vaccinated Health Care Workers Analyzed by Coronavirus Antigen Microarray. *Frontiers in Immunology*, 13(April), 817345. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.817345>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(3), 1. <https://doi.org/10.1038/S41579-020-00459-7>
- Infarmed. (2021). *Vacinas aprovadas- COVID-19 (Quadro Resumo)*. Infarmed. <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/vacinas-aprovadas>



- Jin, P., Li, J., Pan, H., Wu, Y., & Zhu, F. (2021). Immunological surrogate endpoints of COVID-2019 vaccines: the evidence we have versus the evidence we need. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00481-y>
- Kadkhoda, K. (2021). Herd Immunity to COVID-19: Alluring and Elusive. *American Journal of Clinical Pathology*, 155(4), 471–472. <https://doi.org/10.1093/AJCP/AQAA272>
- Koch, T., Mellinghoff, S. C., Shamsrizi, P., Addo, M. M., & Dahlke, C. (2021). Correlates of Vaccine-Induced Protection against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 9(3), 238. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030238>
- Korth, J., Wilde, B., Dolff, S., Anastasiou, O. E., Krawczyk, A., Jahn, M., Cordes, S., Ross, B., Esser, S., Lindemann, M., Kribben, A., Dittmer, U., Witzke, O., & Herrmann, A. (2020). SARS-CoV-2-specific antibody detection in healthcare workers in Germany with direct contact to COVID-19 patients. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104437. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2020.104437>
- Kristiansen, P. A., Page, M., Bernasconi, V., Mattiuzzo, G., Dull, P., Makar, K., Plotkin, S., & Knezevic, I. (2021a). WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *The Lancet*, 397(10282), 1347–1348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00527-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00527-4)
- Kristiansen, P. A., Page, M., Bernasconi, V., Mattiuzzo, G., Dull, P., Makar, K., Plotkin, S., & Knezevic, I. (2021b). WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. *The Lancet*, 397(10282), 1347–1348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00527-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00527-4)
- Leeds, J. S., Raviprakash, V., Jacques, T., Scanlon, N., Cundall, J., & Leeds, C. M. (2020). Risk factors for detection of SARS-CoV-2 in healthcare workers during April 2020 in a UK hospital testing programme. *EClinicalMedicine*, 26, 100513. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2020.100513>
- Legros, V., Denolly, S., Vogrig, M., Boson, B., Siret, E., Rigaille, J., Pillet, S., Grattard, F., Gonzalo, S., Verhoeven, P., Allatif, O., Berthelot, P., Péliissier, C., Thiery, G., Botelho-Nevers, E., Millet, G., Morel, J., Paul, S., Walzer, T., ... Pozzetto, B.

- (2021). A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(2), 318–327. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00588-2>
- 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>
- 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>
- 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. (2020). 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>
- Malipiero, G., Moratto, A., Infantino, M., D'Agaro, P., Piscianz, E., Manfredi, M., Grossi, V., Benvenuti, E., Bulgaresi, M., Benucci, M., & Villalta, D. (2021). Assessment of humoral and cellular immunity induced by the BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers, elderly people, and immunosuppressed patients with autoimmune disease. *Immunologic Research*, 69(6), 576–583.

<https://doi.org/10.1007/s12026-021-09226-z>

- Meister, T., Pisarev, H., Kolde, R., Kalda, R., Suija, K., Milani, L., Karo-Astover, L., Piirsoo, M., & Uusküla, A. (2022). Clinical characteristics and risk factors for COVID-19 infection and disease severity: A nationwide observational study in Estonia. *PloS One*, *17*(6), e0270192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270192>
- 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>
- Milner, J. J., & Beck, M. A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, *71*(2), 298–306. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000158>
- 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>
- Morgiel, E., Szmyrka, M., Madej, M., Sebastian, A., Sokolik, R., Andrasiak, I., Chodyra, M., Walas-Antoszek, M., Korman, L., & Świerkot, J. (2022). Complete (Humoral and Cellular) Response to Vaccination against COVID-19 in a Group of Healthcare Workers-Assessment of Factors Affecting Immunogenicity. *Vaccines*, *10*(5), 710. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050710>
- 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>
- Naaber, P., Jürjenson, V., Adamson, A., Sepp, E., Tserel, L., Kisand, K., & Peterson, P. (2021). Antibody Response After COVID-19 mRNA Vaccination in Relation to Age, Sex, and Side Effects. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3831845>

- Narasimhan, M., Mahimainathan, L., Araj, E., Clark, A. E., Markantonis, J., Green, A., Xu, J., SoRelle, J. A., Alexis, C., Fankhauser, K., Parikh, H., Wilkinson, K., Reczek, A., Kopplin, N., Yekkaluri, S., Balani, J., Thomas, A., Singal, A. G., Sarode, R., & Muthukumar, A. (2021). Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered, and Vaccinated Groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00388-21>
- Olariu, T. R., Ursoniu, S., Marincu, I., & Lupu, M. A. (2021). Dynamics of Antibody Response to BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: A 7-Month Follow-Up Study. *Medicina*, 57(12), 1330. <https://doi.org/10.3390/medicina57121330>
- Oliveira-Silva, J., Reis, T., Lopes, C., Batista-Silva, R., Ribeiro, R., Marques, G., Pacheco, V., Rodrigues, T., Afonso, A., Pinheiro, V., Araújo, L., Rodrigues, F., & Antunes, I. (2022a). Humoral response to the SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine: Real-world data from a large cohort of healthcare workers. *Vaccine*, 40(4), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.12.014>
- Oliveira-Silva, J., Reis, T., Lopes, C., Batista-Silva, R., Ribeiro, R., Marques, G., Pacheco, V., Rodrigues, T., Afonso, A., Pinheiro, V., Araújo, L., Rodrigues, F., & Antunes, I. (2022b). Long-term serological SARS-CoV-2 IgG kinetics following mRNA COVID-19 vaccine: real-world data from a large cohort of healthcare workers. *International Journal of Infectious Diseases*, 122(January), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.05.026>
- Ong, D. S. Y., Fragkou, P. C., Schweitzer, V. A., Chemaly, R. F., Moschopoulos, C. D., & Skevaki, C. (2021). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(7), 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001>
- Our World in Data. (2021). *Share of people vaccinated against COVID-19 - Our World in Data*. Global Change Data Lab. [https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID\\_WRL](https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL)
- Padoan, A., Bonfante, F., Pagliari, M., Bortolami, A., Negrini, D., Zuin, S., Bozzato, D., Cosma, C., Sciacovelli, L., & Plebani, M. (2020). Analytical and clinical

- performances of five immunoassays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in comparison with neutralization activity. *EBioMedicine*, 62, 103101. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103101>
- Padoan, A., Cosma, C., Della Rocca, F., Barbaro, F., Santarossa, C., Dall’Olmo, L., Galla, L., Cattelan, A., Cianci, V., Basso, D., & Plebani, M. (2022). A cohort analysis of SARS-CoV-2 anti-spike protein receptor binding domain (RBD) IgG levels and neutralizing antibodies in fully vaccinated healthcare workers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 60(7), 1110–1115. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0322>
- 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>
- Parohan, M., Yaghoubi, S., Seraji, A., Javanbakht, M. H., Sarraf, P., & Djalali, M. (2021). Risk factors for mortality in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Aging Male*, 23(5), 1416–1424. [https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1774748/SUPPL\\_FILE/ITAM\\_A\\_1774748\\_SM9826.DOCX](https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1774748/SUPPL_FILE/ITAM_A_1774748_SM9826.DOCX)
- Patanavanich, R., & Glantz, S. A. (2020). Smoking Is Associated With COVID-19 Progression: A Meta-analysis. *Nicotine & Tobacco Research*, 22(9), 1653. <https://doi.org/10.1093/NTR/NTAA082>
- Pijls, B. G., Jolani, S., Atherley, A., Derckx, R. T., Dijkstra, J. I. R., Franssen, G. H. L., Hendriks, S., Richters, A., Venemans-Jellema, A., Zalpuri, S., & Zeegers, M. P. (2021). Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. *BMJ Open*, 11(1), e044640. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-044640>
- 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). <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/130399862/details/maximized>
- Presidência de Republica. (2020a). *Legislação COVID-19*. Diário Da República. <https://dre.pt/dre/geral/legislacao-covid-19>
- Presidência de Republica. (2020b). Vacinação de grupos prioritários deve começar a 27 de dezembro - XXII Governo - República Portuguesa. *Diário Da República*. <https://www.portugal.gov.pt/pt/gc22/comunicacao/noticia?i=vacinac>
- Presidência de Republica. (2020c). Vacinação de grupos prioritários deve começar a 27 de dezembro - XXII Governo - República Portuguesa. *Diário Da República*. <https://www.portugal.gov.pt/pt/gc22/comunicacao/noticia?i=vacinacao-de-grupos-prioritarios-deve-comecar-a-27-de-dezembro>
- Pulliam, J. R. C., van Schalkwyk, C., Govender, N., von Gottberg, A., Cohen, C., Groome, M. J., Dushoff, J., Mlisana, K., & Moultrie, H. (2022). Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science*, 376(6593). <https://doi.org/10.1126/science.abn4947>
- Salah, H. M., & Mehta, J. L. (2021). Hypothesis: Sex-Related Differences in ACE2 Activity May Contribute to Higher Mortality in Men Versus Women With COVID-19. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 26(2), 114–118. [https://doi.org/10.1177/1074248420967792/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1074248420967792-FIG2.JPEG](https://doi.org/10.1177/1074248420967792/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1074248420967792-FIG2.JPEG)
- 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>
- Sarstedt AG & Co. KG. (2022). Condições de centrifugação para o S-Monovette®. *Sarstedt*.
- Sattar, N., & Valabhji, J. (2021). Obesity as a Risk Factor for Severe COVID-19: Summary of the Best Evidence and Implications for Health Care. *Current Obesity Reports*, 10(3), 282–289. <https://doi.org/10.1007/s13679-021-00448-8>

- 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). *Certificado de vacinação*. Serviço Nacional de Saúde. <https://www.sns24.gov.pt/guia/certificado-digital-covid-da-ue/certificado-de-vacinacao/>
- Serviço Nacional de Saúde. (2022b). *Testes e tratamento- COVID-19 /SNS24*. Serviço Nacional de Saúde. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/testes-e-tratamento/#sec-2>
- Serviço Nacional de Saúde. (2022c). *Vacina COVID-19 | SNS24. Serviço Nacional de Saúde*. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/prevencao/vacina-covid-19/#sec-0>
- Spilchuk, V., Arrandale, V. H., & Armstrong, J. (2022). Potential risk factors associated with COVID-19 in health care workers. *Occupational Medicine*, 72(1), 35–42. <https://doi.org/10.1093/OCCMED/KQAB148>
- Taslem Mourosi, J., Anwar, S., & Hosen, M. J. (2022). The sex and gender dimensions of COVID-19: A narrative review of the potential underlying factors. *Infection, Genetics and Evolution*, 103, 105338. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2022.105338>
- Tengku Khalid, T. N. F., Wan Mohammad, W. M. Z., Ab Samat, R., & Nik Husain, N. R. (2022). Predictors of tuberculosis disease in smokers: a case-control study in northeastern Malaysia. *PeerJ*, 10, e13984. <https://doi.org/10.7717/peerj.13984>
- Tiwari, A. K., Negi, G., Jaiswal, R. M., Aggarwal, G., Yadav, N., Kumar, V., & Kulathu, K. (2021). Correlation of sample-to-cut-off ratio of anti-SARS-CoV-2 IgG antibody chemiluminescent assay with neutralization activity: a prospective multi-centric study in India. *ISBT Science Series*, 16(4), 269–275. <https://doi.org/10.1111/voxs.12644>
- Tré-Hardy, M., Cupaiolo, R., Wilmet, A., Antoine-Moussiaux, T., Della Vecchia, A., Horeanga, A., Papeux, E., Vekemans, M., Beukinga, I., & Blairon, L. (2021).

- Immunogenicity of mRNA-1273 COVID vaccine after 6 months surveillance in health care workers; a third dose is necessary. *The Journal of Infection*, 83(5), 559. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2021.08.031>
- Uysal, E. B., Gümüş, S., Bektöre, B., Bozkurt, H., & Gözalan, A. (2022). Evaluation of antibody response after COVID-19 vaccination of healthcare workers. *Journal of Medical Virology*, 94(3), 1060–1066. <https://doi.org/10.1002/jmv.27420>
- 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>
- Vilas Boas, J., Brito, T., Sampaio, F., & Barbosa, C. (2021). Relação entre Idade e Imunidade para a COVID-19 em Profissionais de Saúde. *Revista Portuguesa de Saúde Ocupacional*, 12, 13–21. <https://doi.org/10.31252/RPSP.27.11.2021>
- Viveiros, A., Rasmuson, J., Vu, J., Mulvagh, S. L., Yip, C. Y. Y., Norris, C. M., & Oudit, G. Y. (2021). Sex differences in COVID-19: Candidate pathways, genetics of ACE2, and sex hormones. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 320(1), H296–H304. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00755.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-AHRT200091F004.JPEG>
- Wadhwa, A., Yin, S., Freeman, B., Hershow, 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>
- Wang, H., Wiredja, D., Yang, L., Bulterys, P. L., Costales, C., Röltgen, K., Manalac, J., Yee, J., Zehnder, J., Shi, R. Z., Boyd, S. D., & Pinsky, B. A. (2021). Case-Control Study of Individuals with Discrepant Nucleocapsid and Spike Protein SARS-CoV-2 IgG Results. *Clinical Chemistry*, 67(7), 977–986. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab045>
- Wang, Z., Muecksch, F., Muenn, F., Cho, A., Zong, S., Raspe, R., Ramos, V., Johnson,



- B., Ben Tanfous, T., DaSilva, J., Bednarski, E., Guzman-Cardozo, C., Turroja, M., Millard, K. G., Tober-Lau, P., Hillus, D., Yao, K.-H., Shimeliovich, I., Dizon, J., ... Gaebler, C. (2022). Humoral immunity to SARS-CoV-2 elicited by combination COVID-19 vaccination regimens. *Journal of Experimental Medicine*, 219(10). <https://doi.org/10.1084/JEM.20220826/213420>
- Whitaker, H. J., Elgohari, S., Rowe, C., Otter, A. D., Brooks, T., Linley, E., Hayden, I., Ribeiro, S., Hewson, J., Lakhani, A., Clarke, E., Tsang, C., Campbell, C. N., Ramsay, M., Brown, K., & Amirthalingam, G. (2021). Impact of COVID-19 vaccination program on seroprevalence in blood donors in England, 2021. *Journal of Infection*, 83(2), 237–279. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.04.037>
- Wolszczak-Biedrzycka, B., Bieńkowska, A., & Dorf, J. (2021). Assessment of Post-Vaccination Antibody Response Eight Months after the Administration of BNT1622b2 Vaccine to Healthcare Workers with Particular Emphasis on the Impact of Previous COVID-19 Infection. *Vaccines*, 9(12), 1508. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121508>
- 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). Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report – 22- 11 February 2020. *World Health Organization*, February, 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330991>
- World Health Organization. (2020c). R&D Blueprint and COVID-19. *World Health Organization*. <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>
- World Health Organization. (2020d). WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. In *World Health Organization* (Issue March). <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization. (2020e). WHO International Standard First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136. In *World Health Organization* (Issue 1).

<https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

- World Health Organization. (2021). *Coronavirus disease (COVID-19)*. World Health Organization. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>
- World Health Organization. (2022). *Tracking SARS-CoV-2 variants*. World Health Organization. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA*, 323(13), 1239. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 172, 112752. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>
- Zhao, Q., Meng, M., Kumar, R., Wu, Y., Huang, J., Lian, N., Deng, Y., & Lin, S. (2020). The impact of COPD and smoking history on the severity of COVID-19: A systemic review and meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 1915–1921. <https://doi.org/10.1002/jmv.25889>
- 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. *The Lancet Microbe*, 3(2), e81–e82. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00307-4)
- Zimmermann, P., & Curtis, N. (2019). Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>

## ANEXOS

---

## ANEXO I- Instrumento de recolha de dados



### Imunidade Pós-Vacinação

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO: CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MONTANHA (IPB) e UNIDADE LOCAL DE SAÚDE DO NORDESTE

Não há respostas certas ou erradas, apenas se pretende saber a sua opinião relativamente a cada item. O preenchimento de todos os itens é muito importante para a equipa de investigação e para os resultados do estudo.

As respostas ao questionário são anónimas e confidenciais.

A participação é voluntária: tem direito a decidir se quer ou não participar e poderá desistir a qualquer momento, sem qualquer transtorno.

As informações sobre o estudo serão disponibilizadas aos participantes que o solicitarem.

E-mail \*

Seu e-mail \_\_\_\_\_

Número de ID de participante (a preencher pelo investigador responsável pela colheita).

Sua resposta \_\_\_\_\_

Aceita participar no estudo? \*

Sim

Não

1

Com qual género se identifica? \*

Feminino

Masculino

Prefiro não dizer

Outro: \_\_\_\_\_

Indique por favor a sua Profissão/Ocupação:

Sua resposta \_\_\_\_\_

Indique a data de nascimento \*

Data

dd/mm/aaaa

Qual é a sua nacionalidade? \*

Sua resposta \_\_\_\_\_

Indique o seu peso aproximado (Kg).

Sua resposta \_\_\_\_\_

Indique a sua altura (cm)

Sua resposta \_\_\_\_\_

2

É fumador?

Sim

Não

---

Se é fumador, indique há quanto tempo (meses, anos).

Sua resposta \_\_\_\_\_

---

Se é fumador indique o número de cigarros que fuma, em média, por dia.

10 ou menos

de 11 a 20

de 21 a 30

Mais de 31

Outro: \_\_\_\_\_

---

Se já foi fumador na passado, indique o número de anos em que fumou.

Sua resposta \_\_\_\_\_

3

Por favor, indique se tem algum destes sintomas ou doenças. \*

Diabetes

Obesidade

Asma

Insuficiência Cardíaca

Insuficiência Renal

Tensão arterial alta

Anemia

Imunossupressão (SIDA, doenças autoimunes)

Drepanocitose (anemia falciforme; anomalia da produção de hemoglobina, ...)

Doenças inflamatórias (artrite reumatoide, a polimialgia, o lúpus e vasculites)

Doença Oncológica

Se teve doença oncológica, há quanto tempo acabou os tratamentos.....

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Outro: \_\_\_\_\_

---

Toma alguma Medicação?

Sim

Não

4

Se sim, por favor selecione a medicação prescrita:

Insulina

Estatinas

Antidepressivos

Imunossupressores

Antitrombóticos/Agregação plaquetária

Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (pressão arterial alta)

Corticosteroides (ou corticoides, também conhecidos como cortisona, ação anti-inflamatória).

Bloqueadores do receptor da Angiotensina II (Exantema cutâneo, tosse, angioedema, hiperpotassemia: doentes com insuficiência renal)

Outro: \_\_\_\_\_

Recentemente realizou alguma cirurgia ou esteve internado por algum motivo?

Sim

Não

Em caso afirmativo, por favor indique o motivo e em que data ocorreu a hospitalização.

Sua resposta \_\_\_\_\_

Se é doente Oncológico, indique por favor há quanto tempo está em tratamento. Caso tenha terminado, por favor indique há quanto tempo terminou esse mesmo tratamento.

Sua resposta \_\_\_\_\_

5

Já testou positivo para o SARS-COV-2 \*

Sim

Não

Teve sintomas? \*

sim

Não

Em caso afirmativo teve algum destes sintomas?

Febre (temperatura de 38°C ou superior) há mais de 48 horas (a febre não baixa com os medicamentos, ou voltou a ter febre depois de ter estado um dia sem febre)

Tosse persistente (superior a 5 dias) ou diferente do habitual

Dificuldade respiratória (sente falta de ar em repouso ou em pequenos esforços, está a respirar mais depressa do que o habitual ou tem a boca ou unhas arroxeadas)

Dor recente no peito ou nas costas (não considere dores de costas já diagnosticadas ou em tratamento)

Vômitos persistentes e/ou diarreia grave (três ou mais episódios no mesmo dia, que impedem as suas atividades diárias)

Tosse associada a dores de cabeça

Tosse associada a dores musculares

Perda ou alteração do paladar

Perda do olfato

Outro: \_\_\_\_\_

6

Em caso afirmativo, recebeu tratamento?

Internado na Unidade COVID

Internado na UCI

Oxigênio

Ventilação Mecânica

Foi entubado

Outro: \_\_\_\_\_

Já foi vacinado \*

Sim

Não

Não pretendo ser vacinado.

Em caso afirmativo:

A 1ª dose

Vacinação Completa

Foi vacinado só com 1 dose por ter tido a COVID19

Outro: \_\_\_\_\_

Se já foi vacinado em que data tomou a primeira dose?

Data

dd/mm/aaaa:

Em que data tomou a segunda dose ?

Data

dd/mm/aaaa:

7

Após a vacinação teve alguns sintomas? \*

Sim

Não

Qual é a marca da vacina que lhe foi administrada? \*

mRNA - Pfizer-BioNTech

mRNA-1273 Moderna

Vacina baseada em vetores adenovirais, ChAdOx1 S AstraZeneca Oxford

Vacina baseada em vetores adenovirais, COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen Biologics)

Outro: \_\_\_\_\_

Foi infectado após ser vacinado? \*

Sim

Não

Se sim, apresentou sintomas? Indique os sintomas que apresentou tendo em conta os que descritos anteriormente.

Sua resposta \_\_\_\_\_

Qual o seu grupo sanguíneo?

A

B

AB

O

Não Sabe

8

## 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

Confirmo 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.*



## ANEXO III- Parecer da Comissão de Ética



IdeN.º 34/2021

## Parecer da Comissão de Ética

## Identificação do estudo:

Reunião CA 30.9.2021  
 que foi, 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.

*Assinatura manuscrita da Presidente da Comissão de Ética da ULSNE, E.P.E.*

Despacho do P.C.A.: