



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Gabriela Barella Schmidt

Desempenho e acurácia de teste de quimioluminescência para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2: uma análise post-hoc do PLACOVID trial.

Porto Alegre

2023

Gabriela Barella Schmidt

Desempenho e acurácia de teste de quimioluminescência para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2: uma análise post-hoc do PLACOVID trial.

Gabriela Barella Schmidt

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de Mestre em Medicina:Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Medicina:Ciências Médicas.

Orientador:Prof.Dr.Leo Sekine

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Barella Schmidt, Gabriela
Desempenho e acurácia de teste de
quimioluminescência para detecção de anticorpos contra
o SARS-CoV-2: uma análise post-hoc do PLACOVID trial.
/ Gabriela Barella Schmidt. -- 2023.
90 f.
Orientador: Leo Sekine.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. SARS-Cov-2. 2. Anticorpos Neutralizantes. 3.
Quimioluminescência. 4. COVID-19. I. Sekine, Leo,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Desempenho e acurácia de teste de quimioluminescência para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2: uma análise post-hoc do PLACOVID trial.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:31/07/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr Rafael Mendonça da Silva Chakr

PPG-CM;UFRGS;HCPA

Prof Dr.Eduardo Cremonese Filippi Chiela

UFRGS

Prof.Dra.Clévia Rosset

PPG-CM;HCPA

Prof Dra.Ane Katiussa Siqueira Fröhlich da Silva

CESUCA

ORIENTADOR

Prof. Dr Leo Sekine

HCPA

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Mônica e Antônio, pelo amor, educação e apoio durante toda a minha caminhada. Ao meu namorado, Carlos, pelo amor, apoio e ajuda em tudo que lhe era possível nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Leo Sekine, por estar sempre presente, pela paciência e conversas em horas de desespero e por todos os ensinamentos que me trouxe nesse período.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar.

Um agradecimento especial:

- Ao serviço de estatística do HCPA, em especial à Vânia Naomi Hirakata por toda a colaboração durante a construção deste trabalho.
- Ao Prof.º Dr. Eduardo Chiela, que prontamente me aceitou em uma de suas disciplinas para que pudesse fazer meu estágio docente.
- Ao serviço de Hemoterapia (Renata e Carol, da Sorologia) que não mediram esforços para me ajudar.

RESUMO

Introdução: A titulação de anticorpos neutralizantes (nAbs) para o SARS-CoV-2 é o teste padrão ouro para avaliar a imunidade protetora contra a COVID-19, mas seu uso não é adequado para um grande volume de amostras. Para tanto, a quimioluminescência (CLIA) poderia cumprir uma maior carga de trabalho, contudo o limiar de mensuração para soroproteção não está estabelecido. **Objetivo:** Avaliar a correlação entre titulação de nAbs e índice de anticorpos medidos por CLIA e estabelecer um ponto de cutoff para soroproteção. **Método:** Análise post-hoc de dados oriundos do PLACOVID Trial. Índices de CLIA para IgM/IgG e títulos de nAbs foram medidos no plasma convalescente doados por aférese a partir de doadores recrutados durante o estudo. Medidas de performance diagnóstica relativas ao CLIA foram calculadas. **Resultados:** O coeficiente de correlação encontrado entre o índice de CLIA e os títulos de nAbs foram de 0.42 ($P < 0.001$) e 0.33 ($P = 0.002$), para IgG e IgM, respectivamente. Considerando um ponto de corte de título de nAbs de 1:160 ou mais como imunoprotetor, observamos que a área sob a curva ROC, para o índice de CLIA IgM foi 0.73 (95%CI:0.59-0.86; $P = 0.005$), e para IgG, 0.72 (95%CI:0.59-0.85; $P = 0.006$). O melhor ponto de cutoff para o índice IgM foi 0.85 (Sensibilidade: 57.4%/Especificidade: 81.3%), e para IgG, 3.5 (Sensibilidade: 63.2%/Especificidade: 81.3%). **Conclusão:** A correlação entre índices de IgG para SARS-CoV-2 e títulos de nAbs observada foi considerada moderada, com um ponto de cutoff de índice de 3.5 para identificar pacientes com imunidade protetora contra COVID-19 (sensibilidade > 60% e especificidade > 80%).

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, Anticorpo neutralizante, Testes Diagnósticos, Quimioluminescência.

ABSTRACT

Introduction: Titration of neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 is the gold standard test for assessing protective immunity against COVID-19 but its use is not suitable for a large volume of samples. Therefore, chemiluminescence (CLIA) could fulfill a greater workload, but the measurement threshold for seroprotection is not established. Objective: To evaluate the correlation between nAbs titration and antibody index measured by CLIA and to establish a cutoff point for seroprotection. Methodology: Post-hoc analysis of data from the PLACOVID Trial. CLIA indices for IgM/IgG and nAbs titers were measured in convalescent plasma donated by apheresis from donors recruited during the study. Measures of diagnostic performance related to CLIA were calculated. Results: The correlation coefficient found between the CLIA index and the nAbs titers were 0.42 ($P < 0.001$) and 0.33 ($P = 0.002$), for IgG and IgM, respectively. Considering a cutoff point of 1:160 nAbs titer of or more as immunoprotective, we observed that the area under the ROC curve for the IgM CLIA index was 0.73 (95%CI:0.59-0.86; $P = 0.005$), and for IgG 0.72 (95%CI:0.59-0.85; $P = 0.006$). The best cutoff point for the IgM index was 0.85 (Sensitivity: 57.4%/Specificity: 81.3%), and for IgG, 3.5 (Sensitivity: 63.2%/Specificity: 81.3%). Conclusion: The correlation between IgG indices for SARS-CoV-2 and nAbs titers observed was considered moderate, with an index cutoff point of 3.5 to identify patients with protective immunity against COVID-19 (sensitivity > 60% and specificity > 80%).

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Neutralizing Antibody, Diagnostic Tests, Chemiluminescence.

LISTA DE IMAGENS, TABELAS E QUADROS.

1. Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.
2. Figura 2: O ciclo de vida do SARS-CoV-2, retratando a entrada celular e posterior replicação.
3. Figura 3: Benefícios do Plasma Convalescente.
4. Figura 4: LFA, ELISA e CLIA.
5. Figura 5: Marco Conceitual.
6. Figura 6: Cronograma.
7. Quadro 1: Orçamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
APC'S	Antigen Presenting Cells
AST	Aspartato aminotransferase
BoB	Assays or blockade of binding
C5a	Complemento C5a
C5aR	Complement component 5a receptor
C3bBbP	Alternative pathway of C3 convertases
C3bc	Alternative pathway of C3 convertases
C4d	Complemento C4d
CD4+	Cluster of Differentiation 4
CDC	Center of disease control
CD-40L	Cluster of Differentiation 40 ligand
CK	Creatina quinase
CLIA	Chemiluminescence immunoassays
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
COVID-19	Coronavirus disease 2019

CPE-VNT	Cytopathic effect based virus neutralization test
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
EC ₅₀	Half maximal effective concentration
ECA ₂	Enzima conversora de angiotensina 2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FABP4+	Fatty acid-binding protein 4
FAL	Fosfatase Alcalina
FCN1+	Ficolin-1 or M-ficolin
FDA	Food and drug administration
FRNT	Focus reduction neutralization test
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
H ₁ N ₁	Pig influenza
H ₅ N ₁	Avian influenza
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1

IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
INF gamma	Interferon gamma
INF-1	Interferon gamma induced protein 1
IP10	Interferon gamma induced protein 10
IRF- 3	Interferon regulatory transcription factor 3
LDH	Lactato desidrogenase
LFIAs	Lateral flow immunoassays
MASP-2	Mannan binding lectin associated serine protease-2
MBL	Mannose-binding lectin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MERS-COV	Middle east respiratory syndrome coronavirus
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
nAbs	Neutralizing antibodies
NAATs	Nucleic acid amplification tests

NB2	Nível de biossegurança 2
NB3	Nível de biossegurança 3
NF-kB	Nuclear factor-kB
NK	Natural killer
NKG2A	Natural Killer Group 2 A
NLR	Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors
OD	Optical density
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF's	Open reading frames
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PCR	Proteína C reativa
PD-1	Programmed cell death protein 1
PLR	Platelet/Lymphocyte ratio
PRNT	Plaque reduction neutralisation test
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PTE	Pulmonary thromboembolism
POC	Point of care testing
RBD	Receptor-binding domain

RCT	Replication transcription complex
RLR	RIG-I-like receptor
RLU	Relative light units
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver operating characteristic curve
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
sC5b-9	Soluble form of the terminal complement complex C5b-9
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
sVNT	Surrogate virus neutralization test
TCD8 +	T Lymphocytes CD8
TCID50	Median tissue culture infectious dose
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th-1	T helper 1
Th17	T helper 17
TLRs	Toll-Like Receptors
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TP	Tempo de protrombina

TRALI	Transfusion related acute lung injury
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UTI	Unidade de tratamento intensivo
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	1
2.1 Esquematização de bases de dados consultados e estratégias de busca	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 COVID-19 e SARS-CoV-2	4
3.1.2 Alterações laboratoriais na COVID-19	4
3.2 Formação de Anticorpos contra a COVID-19	7
3.2.1 Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa	8
3.3 Plasma Convalescente e PLACOVID Trial	16
3.4 Anticorpos neutralizantes	18
3.5 Testes de detecção de anticorpos contra SARS CoV-2	23
3.5.1 Teste quantitativo para anticorpos IgG	24
3.5.2 Quimioluminescência	28
4. MARCO CONCEITUAL	30
5. JUSTIFICATIVA	31
5.1 Hipótese	31
5.1.1 Hipótese alternativa	31
5.1.2. Hipótese nula	31
6. OBJETIVOS	31
6.1 Objetivo Principal	31
6.2 Objetivos específicos	31
7. MATERIAIS E MÉTODOS	32
7.1 Delineamento da pesquisa	32
7.2 Critérios de inclusão	32
7.3 Critérios de exclusão	32
7.4 Tamanho e cálculo amostral	32
7.5 Descrição das metodologias de detecção de anticorpos utilizadas	33
7.5.1 Princípios Biológicos do teste SARS-CoV 2 IgG Abbott	33
7.5.2 Anticorpo neutralizante	33
7.6 Riscos	34
7.7 Benefícios	34
7.8 Aspectos éticos	35
7.8.1 Lei Geral de Proteção de Dados	35
7.9 Análise estatística	35
7.10 Local de realização	36
7.11 Cronograma	36
7.12 Orçamento	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9. ARTIGO	46

10.CONCLUSÃO	72
11.PERSPECTIVAS FUTURAS	72
12.ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus são uma grande família de vírus comuns infectando muitas espécies diferentes de animais, incluindo camelos, gado, gatos e morcegos. Raramente, os subtipos que infectam animais podem infectar pessoas como, por exemplo, o MERS-CoV e o SARS-CoV. Em dezembro de 2019, foi identificada na cidade de Wuhan na província de Hubei na China, uma pneumonia de causa desconhecida, que posteriormente foi atribuída ao vírus SARS-CoV-2, eventualmente nomeada como COVID-19. A OMS declarou a COVID-19 uma pandemia em 11 de março de 2020. Em 05 de maio de 2023, a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19 (Ministério da Saúde, 2020; OMS, 2020; Buogo, S et al., 2023).

A COVID-19 apresenta um espectro clínico variando de infecções assintomáticas a quadros graves (Ministério da Saúde, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a maioria (cerca de 80%) dos pacientes com COVID-19 podem ser assintomáticos ou oligossintomáticos (poucos sintomas), e aproximadamente 20% dos casos detectados requer atendimento hospitalar.

2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

Foi realizada uma busca eletrônica de artigos, no período de novembro/2020 até setembro/21, indexados em 03 (três) bases de dados: PubMed, Scielo e LILACS. Utilizaram-se os seguintes descritores: COVID-19, COVID-19 Serological Testing, COVID-19 Neutralizing Antibodies e COVID-19 Luminescent Measurements.

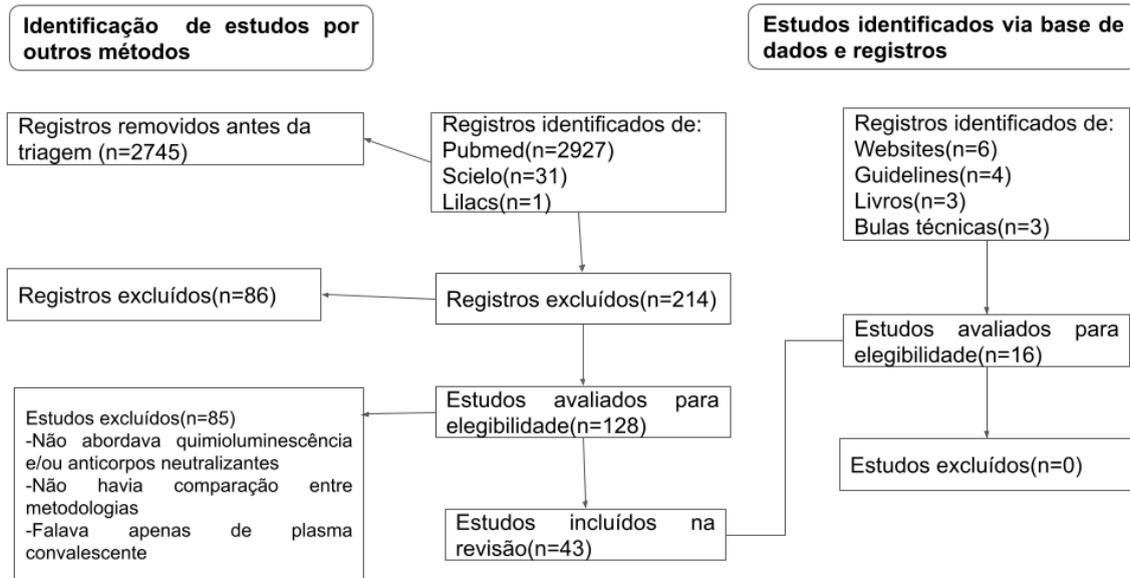
Ao concluir a busca, os artigos foram selecionados a partir da leitura prévia de seus resumos, aqueles que não contemplavam o propósito do estudo foram excluídos (n=86). A exclusão se deu, principalmente, quando o artigo lido, mesmo tratando do tema desempenho e acurácia de teste de quimioluminescência para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2, abordava questões não relevantes para esse projeto. Como critério de inclusão, constam artigos que correspondem ao objetivo da pesquisa e, preferencialmente, estudos recentes (até 5 anos). Foram utilizados 43 artigos,

4 guidelines, 2 bulas técnicas, 5 sites, assim como 3 livros em meio físico para sustentar a questão de pesquisa (Abbott 2020; Ahmed et al 2020; Araújo et al 2020; Bradley et al 2021; Casadevall et al 2020; Chatterjee et al 2020; Chenguang et al 2020; El-Ghitany et al 2022; Euroimmun 2020; European Society of Cardiology 2000; Galipeau et al 2020; Garcia et al 2020; Gao et al 2020; Goldsby et al 2000; Gottlieb et al 2021; Huang et al 2020; Holter et al 2020; Kriz et al; Lau et al 2021; Liao et al 2020; Libster et al 2021; Li et al 2020; Ling et al 2020; Liu et al 2020; Liu et al 2020; Luke et al 2010; Lundgren et al 2021; Lokugamage et al 2020; Mcpherson et al 2012; Meschi et al 2021; Ministério da Saúde 2020; Ministério da Saúde 2021; Montes et al 2022; Nanshan et al 2020; Ndzouboukou et al 2021; Nogueira et al 2020; Organização Mundial da Saúde 2020; Organização Mundial da Saúde 2021; Organização Pan-Americana da Saúde 2020; Parikhani et al 2021; Pereira et al 2020; Plotkin et al 2012; Roback et al 2020; Santiesteban-Lores et al 2021; Sharun et al 2020; Sekine et al 2022; Shen et al 2020; Silva et al 2020; Tali et al 2021; Tay et al 2020; Ting Gao et al 2020; Wendel et al 2020; Wiersinga et al 2020; Zheng et al 2020; Zheng et al 2020).

2.1 Esquematização de bases de dados consultados e estratégias de busca

A imagem abaixo resume a estratégia de busca das referências bibliográficas nas bases de dados que fundamentam os objetivos do estudo.

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas



Fonte: Elaborada pela própria autora

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COVID-19 e SARS-CoV-2

O coronavírus é um vírus RNA de fita simples, envelopado, que tem entre 60 nm-140 nm de diâmetro e apresenta projeções em sua superfície, daí o nome coronavírus, em alusão a uma coroa. Outros vírus da mesma família também causam doença em humanos e normalmente causam síndromes respiratórias, por exemplo, MERS-CoV e SARS-CoV. SARS-CoV-2 é o agente responsável pela COVID-19, e é em média 50% geneticamente compatível com MERS-CoV e possui 79% de homologia com SARS-CoV, pois existem muitas variantes do vírus. Os sintomas mais frequentes da COVID-19 são febre, tosse seca, mialgia, fadiga, dispneia, dor de cabeça e coriza (Pereira, et al.,2020).

Como meios de transmissão pode-se citar: os aerossóis, superfícies infectadas, gotículas expelidas na tosse ou espirro (perdigotos). O período médio de incubação é de 5 dias (2-7), sendo que 97,5% dos infectados desenvolvem sintomas em 11,5 dias. Algumas complicações que a doença pode acarretar são: disfunção cardíaca (arritmias, cardiomiopatia, miocardite), disfunção hemodinâmica, problemas cerebrais (encefalite, problemas cerebrovasculares), problemas pulmonares, hepáticos, renais e no sistema de coagulação (coagulação intravascular disseminada, tromboembolismo venoso e arterial) (Wiersinga, et al.,2020).

3.1.2 Alterações laboratoriais na COVID-19

Além do quadro clínico característico, a COVID-19 costuma levar a alterações de natureza laboratorial. Alguns exames laboratoriais que se encontram alterados na COVID-19 são: D-dímero, lactato desidrogenase (LDH), hemograma, ferritina sérica, proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), creatina quinase (CK), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), bilirrubina total, tempo de protrombina (TP), fibrinogênio, tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA).

O dímero D plasmático é um produto de degradação da fibrina e demonstrou ser altamente sensível (acima de 99%) na detecção de casos de

trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP) (Task Force on Pulmonary Embolism, European Society of Cardiology). Em estudo realizado por Garcia-Olivé et al (2020), observou-se que pacientes com diagnóstico de COVID-19 que possuem níveis mais elevados de D-dímero foram associados a uma maior probabilidade de desenvolver TEP 3, 6, 9 e 12 dias após a identificação dos níveis elevados de D-dímero.

O LDH foi um preditor independente de morte em adultos saudáveis com COVID-19 e um fator de risco para morte em pacientes com doenças cardiovasculares, refletindo o dano direto às células miocárdicas (Pereira, et al. 2020).

Segundo Pereira et al (2020), parâmetros de coagulação (TP, fibrinogênio, TTPA) anormais foram mais frequentes em pacientes infectados pelo coronavírus que morreram do que naqueles que sobreviveram. Especificamente, os valores de TP, D-dímero e fibrinogênio foram 1,14, 3,5 e 1,9 vezes maiores em não sobreviventes do que em sobreviventes respectivamente.

Em relação ao hemograma de pacientes diagnosticados com COVID-19, é reportado leucopenia, cuja frequência varia entre 9,1% até 33,7%, linfopenia entre 35,3% até 82,1%, plaquetopenia entre 5% e 36,2%, neutrofilia, monocitopenia e eosinofilia. Com relação à linfopenia, números abaixo de 1.000 linfócitos/mcL estariam associados com apresentações mais graves da doença. Também foi relatado que os pacientes não sobreviventes desenvolveram linfopenia e leucocitose com mais frequência, junto com valores anormais de D-dímero e função renal comprometida (Pereira, et al. Ahmed-Hassan et al. 2020).

Estudo de Pereira et al (2020) analisou o número de plaquetas em pacientes durante o tratamento para COVID-19. A análise univariada do estudo mostrou que a idade, os picos plaquetários e o *platelet/lymphocyte ratio* (PLR), durante o pico de plaquetas, foram fatores associados à gravidade dos pacientes, enquanto uma análise multivariada mostrou que o valor de PLR durante o pico foi um fator independente em relação à gravidade dos pacientes.

O número máximo de plaquetas ou picos durante o tratamento em pacientes graves era em média 392.000/mcL, significativamente maior do que a média de de pacientes não graves (301.000/mcL). Além disso, uma contagem de eosinófilos mais baixa e crescente pode ser um sinal de progressão e recuperação de COVID-19, respectivamente (Chen et al, 2020; Liu, F et al, 2020).

Há um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, no soro dos pacientes com COVID-19, como interleucinas (IL-1, IL-6, e IL-12), interferon-gama, proteína induzida por interferon 10 (IP10), proteínas de macrófago 1A (MIP-1A) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), que também são associados com inflamação pulmonar e lesão pulmonar grave. Além disso, outras citocinas, como IL-7, IL-2, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também tiveram maiores níveis plasmáticos em pacientes, quando comparados com adultos saudáveis (Pereira, et al.; Ahmed-Hassan et al. 2020).

Estudo realizado no Hospital Jin Yintan (Wuhan, China), com indivíduos com COVID-19 grave, apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP1, MIP1 α e TNF α (Huang, C et al., 2020).

Um outro estudo de Liu J et al (2020), mostrou que a concentração sérica de IL-6, IL-10, IL-2 e IFN- γ era maior nos doentes graves do que nos leves. Nos doentes graves, a diminuição da IL-6 foi mais tardia, ocorrendo a partir do 16º dia de sintomas.

Além disso, observa-se elevação dos valores de ferritina sérica, proteína C reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação, D-dímero, creatina quinase (CK), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), bilirrubina total e valores reduzidos albumina. (Pereira, et al. 2020).

3.2 Formação de Anticorpos contra a COVID-19

Semelhante a outros coronavírus, o SARS-CoV-2 contém um genoma de RNA de fita simples coberto com uma membrana de proteína e proteínas spikes (S) em sua superfície. A proteína de superfície S desempenha um papel fundamental no ciclo de vida viral e na resposta de defesa do hospedeiro. A

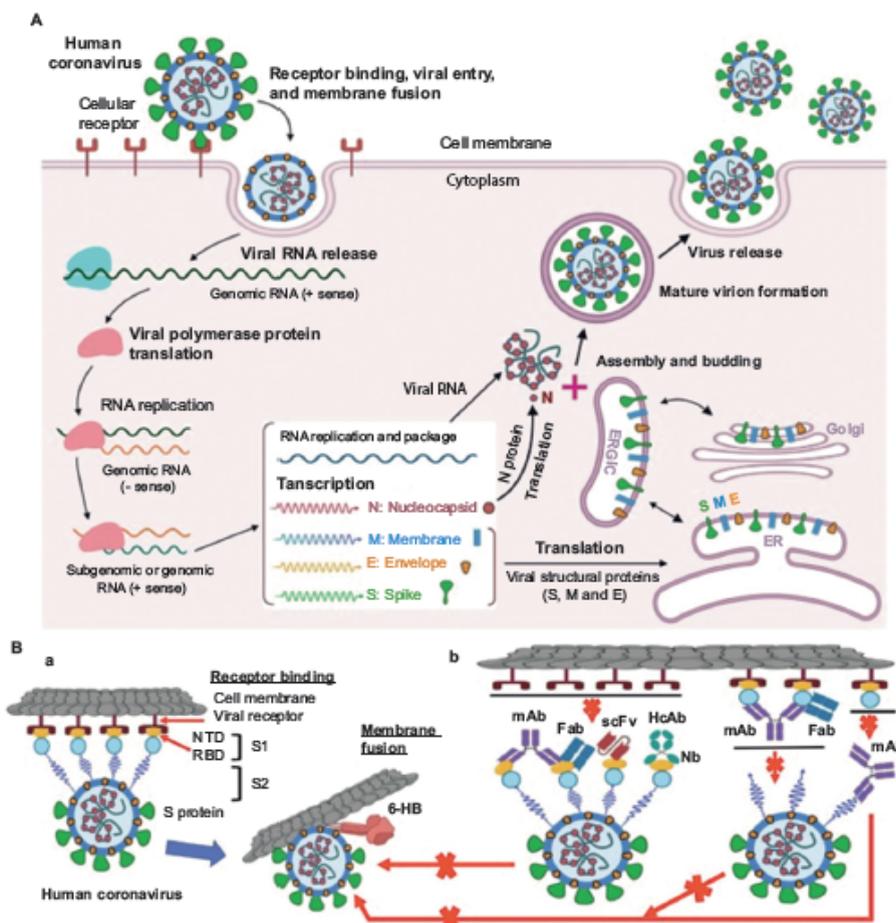
glicoproteína dessas proteínas spikes tem uma forma única de ligação com a proteína da membrana celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), na superfície das células hospedeiras (Kriz et al.2020).

A virulência do vírus SARS-Cov-2 é atribuído às suas proteínas estruturais que permitem que ele entre no corpo humano e se replique. Conseqüentemente, a atividade genômica e a replicação são essenciais para sua patogenicidade (Kriz et al.,2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus RNA de fita simples sentido positivo com uma capa 5' e uma cauda poliA na extremidade 3'. A transcrição do vírus ocorre entre estruturas de leitura aberta (ORFs) encontradas no RNA. Até 6 ORFs podem estar presentes em um complexo de replicação-transcrição (RCT). O resultado desta transcrição é um conjunto de proteínas estruturais, proteínas envelopadas, proteínas spike e nucleocapsídeos. Mutações de deslocamento de quadro entre estes ORFs podem levar a novos e diferentes tipos de proteínas, aumentando a patogenicidade (Kriz et al.,2020).

Estudos mostram que ambos os vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 compartilham uma estrutura de glicoproteína spike no *receptor-binding domain* (RBD), que é responsável pela afinidade com a enzima ECA-2. O vírion infecta a célula ligando sua glicoproteína aos receptores da célula hospedeira, levando à fusão e inserção de componentes de replicação viral no hospedeiro. A interação entre a glicoproteína de superfície (*spike*) nos virions e as enzimas ECA-2 humanas iniciam o processo inflamatório e a quantidade da enzima pode estar relacionada à extensão da inflamação do órgão (Wan et al;Kriz et al.,2020).

Figura 2. O ciclo de vida do SARS-CoV-2, retratando a entrada celular e posterior replicação.



Fonte.Retirada do livro Breaking COVID.Kriz et al,2020.

3.2.1 Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa

A infecção pelo coronavírus ativa tanto a imunidade inata como a imunidade humoral, assim como a imunidade celular adquirida. A primeira linha de mecanismo de defesa contra microorganismos em humanos é mediada pelo sistema imunológico inato. As células-chave do processo inflamatório incluem neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK). Essas células utilizam mecanismos como proteínas de reconhecimento celular para identificar células estranhas e removê-las do corpo (Kriz et al., 2020).

Já o sistema imunológico adaptativo, pode ser dividido em humoral e celular. A imunidade humoral é impulsionada por células B que secretam

anticorpos para proteger o corpo de microorganismos, tanto de forma imediata como no longo prazo. O evento cardinal envolve receptores nas células B que se ligam a um antígeno. Esta ligação promove ativação e diferenciação em células mais especializadas. O processo de maturação antígeno-dependente do timo leva as células B a assumirem funções mais específicas. A ligação desses antígenos extrínsecos ativa as células T auxiliares que, em seguida, ativam as células B para secretar tipos específicos de anticorpos (Kriz et al.,2020).

A imunidade celular é um dos mecanismos de defesa do hospedeiro que é projetado para combater agentes intracelulares, como vírus e micobactérias, assim como células tumorais. O mesmo sistema também pode ser responsável por doenças autoimunes. As células T são o principal condutor da imunidade mediada por células. Embora haja vários tipos de células T, as células CD4 e CD8, são consideradas as mais importantes para mensurar a imunidade dos pacientes (Kriz et al.,2020).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo. Durante uma infecção viral, pode atuar inibindo a replicação viral e promovendo ao *clearance* viral, e funciona como desencadeador da resposta imune adaptativa. Os vírus são reconhecidos pelo sistema imune através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Existem diferentes tipos de PRRs que induzem respostas diferentes de acordo com a via de sinalização ativada. Alguns PRRs como os *toll-like receptors* (TLRs), os *RIG-I-like receptor* (RLR) e os *nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors* (NLR), quando expostos à ameaça por um vírus, promovem a síntese de interferon (INF) do tipo I (Silva, et al 2020).

A ativação da via do INF limita a replicação vírica e induz a resistência de células não infectadas à infecção. Assim, alguns vírus como o SARS-CoV, embora sensíveis ao IFN, apresentam mecanismos de evasão à resposta antiviral do hospedeiro mediada pelo interferon. No caso do SARS-CoV, esta propriedade de evasão está associada à proteína do nucleocapsídeo (N) (Silva, et al 2020).

Num estudo laboratorial realizado na Universidade do Texas, os investigadores compararam a replicação vírica do SARS-CoV e do

SARS-CoV-2 em cultura de células Vero pré-tratada com IFN-I (IFN- α). Os resultados mostraram uma redução significativa do título viral na cultura de SARS-CoV-2 pré-tratada com IFN-I quando comparado com a cultura isenta de IFN-I, e que esta redução não se verificou na cultura pré-tratada de SARS-CoV. Adicionalmente, avaliando a produção de proteínas, foi constatado um déficit de proteína N na cultura de SARS-CoV-2 pré-tratada com IFN-I. A sensibilidade do SARS-CoV-2 ao IFN-I é diferente da previamente descrita para o SARS-CoV, sugerindo que o novo coronavírus tenha interações diferentes com o hospedeiro que podem determinar resultados clínicos distintos (Lokugamage, K et al 2020; Silva et al, 2020).

Tay M et al (2020) explica o fenômeno que chamamos de tempestade de citocinas ou síndrome de liberação de citocinas. A replicação ativa do SARS-CoV-2 e a sua liberação causam a piroptose das células hospedeiras infectadas e a consequente liberação de moléculas associadas ao dano. Estas moléculas são reconhecidas como sinais de perigo por células epiteliais, endoteliais e pelos macrófagos alveolares, levando à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, IFN γ , MIP 1 α e 1 β , MCP 1, IP-10). Estas proteínas recrutam leucócitos (predominantemente células T e monócitos) ao local de infecção.

Na maioria dos doentes, as células recrutadas eliminam a infecção e a resposta imune recua de forma controlada. No entanto, em alguns casos, este recrutamento celular resulta em infiltração pulmonar por células do sistema imune, desencadeando a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias e a consequente lesão pulmonar, bem como disfunção multiorgânica pelos efeitos sistêmicos destas proteínas (Silva, et al 2020).

Liao M et al (2020) caracterizaram a população leucocitária broncoalveolar em doentes com COVID-19 e encontraram um predomínio de macrófagos derivados de monócitos (FCN1+), com capacidade fortemente pró-inflamatória e de produção de quimiocinas nos doentes graves, potencialmente desencadeadores de tempestade de citocinas, contrariamente aos doentes com formas leves, nos quais predominam macrófagos alveolares (FABP4+).

A imunidade adaptativa caracteriza-se pela especificidade e memória da resposta imune. As células T têm um papel antiviral importante, particularmente

os linfócitos T CD4+ e T CD8+ .As células T CD8+ têm função citotóxica direta contra células infectadas pelo vírus, enquanto as células T CD4+ são cruciais na estimulação da imunidade mediada por anticorpos, na preparação de células T CD8+ e na produção de citocinas(Silva,et al 2020).

Outro tipo de células importantes são as células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), presentes nos tecidos infectados, que funcionam como ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida, uma vez que são responsáveis por apresentar peptídeos víricos aos linfócitos.Na infecção por SARS-CoV, uma vez ativadas,os linfócitos T CD4+ expressam IFN γ , TNF α e IL-2, sugerindo uma resposta do tipo Th1, ou seja, mediada por células(Silva,et al 2020).

Usando o modelo de SARS-CoV, todas as células T de memória são dirigidas contra proteínas estruturais do vírus e existe alguma evidência de que a resposta mediada por células T às proteínas S, M e N é duradoura e persistente.No entanto, no que se refere à infecção por SARS-CoV-2 pouco se sabe quanto à especificidade e à duração da imunidade mediada por células T(Silva,et al 2020).

Na COVID-19, a exaustão de células T e a redução da sua diversidade funcional prediz doença grave.O estudo de Zheng HY et al(2020) incluiu 16 doentes com COVID-19 (10 graves e 6 leves) em comparação com controles saudáveis, com o objetivo de avaliar a exaustão e a funcionalidade de linfócitos T na COVID-19. Os autores descrevem que moléculas relacionadas com a ativação e regulação de células T estão aumentadas em doentes comparado aos controles, enquanto as relacionadas com a função estão diminuídas nos doentes graves em comparação aos leves.

Os níveis de enzimas indutoras de apoptose de células alvo nos linfócitos T CD8+ foi superior nos doentes graves, assim como os seus níveis de moléculas reguladoras.Neste estudo, comparando os controles saudáveis e os doentes leves, a frequência de linfócitos T CD4+ multifuncionais (positivos para pelo menos duas citocinas) foi significativamente menor no grupo de doentes graves, enquanto a proporção de células não-funcionais caracterizadas pela ausência de expressão de IFN γ , TNF α e IL-2 foi superior(Zheng HY et al,2020).

Nos linfócitos T CD8+, a frequência de células não-exaustas, que não expressam PD-1, CTLA-4 e TIGIT, foi menor na doença grave. Sendo o bloqueio funcional de PD-1, CTLA-4 e TIGIT benéfico para os linfócitos T CD8+ manterem imunidade antígeno-específica duradoura e os seus efeitos antivirais, a exaustão excessiva das células T CD8+ na doença grave pode comprometer a resposta celular ao SARS-CoV-2. Os autores identificaram a perda da diversidade funcional dos linfócitos T CD4+ e o aumento da expressão de moléculas reguladoras nos linfócitos T CD8+ como fatores imunológicos distintivos de gravidade da COVID-19. (Zheng HY et al, 2020).

Zheng M et al (2020) estudaram 68 doentes, 13 dos quais graves, usando a expressão de NKG2A como marcador de exaustão das células NK e dos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Verificaram que na COVID-19, na admissão hospitalar, a expressão de NKG2A está significativamente aumentada em comparação aos controles saudáveis, e que, na fase de convalescença, a contagem de linfócitos T CD8+ aumenta e a porcentagem de linfócitos T CD8+ NKG2A+ diminui. Os autores concluem que a expressão de NKG2A se relaciona com a exaustão funcional dos linfócitos citotóxicos e com a progressão da doença numa fase precoce da infecção.

As células CD4 + são células T auxiliares e são ativadas nos linfonodos quando as células dendríticas capturam antígenos estranhos e os apresentam às células T. Os receptores que possuem essas APC's devem ser acompanhados por um co-sinal de ligação entre CD-40L nas células CD4+ para que o efeito ocorra. Importante mencionar que esses antígenos tendem a ser baseados em peptídeos e também formam a base para vacinas, como a da difteria. A interação das células CD4 com o antígeno determina o destino destas células T. As citocinas conduzem essa diferenciação. Por meio da imunidade inata, a IL-12 e o interferon gama são produzidos, transformando células CD4 + em células Th-1. Essas células, então, secretam mais IL-12 e IFN gama, que induzem as células B a secretar IgG e também ativam macrófagos. (Kriz et al., 2020).

Segundo Kriz et al (2020), torna-se um ciclo de autorregulação. Células CD4 *naive* são convertidas em células Th-1 por certas citocinas, Th-1 secretam citocinas próprias, que preparam uma resposta imune robusta, resultando em

uma condição pró-inflamatória que desempenha um papel essencial na erradicação do vírus.

A infecção começa através da entrada do SARS-CoV-2 nas células epiteliais. Posteriormente, o vírus induz apoptose e as células hospedeiras são danificadas e lisadas seguindo a replicação do vírus. Os antígenos virais são apresentados às células TCD8 +, bem como às células *natural killer*. As células dendríticas subepiteliais, bem como macrófagos de tecido, podem reconhecer os antígenos de SARS-CoV-2 e apresentá-los a célula T CD4 + através de MHC de classe II após a ruptura do epitélio, desencadeando a diferenciação das células T em células T helper (Th1, Th17 e T helper folicular) (Parikhani, et al., 2021).

As T helper folicular são células que podem ajudar os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos e promovem a geração de vários isotipos de anticorpos que começam com a produção de IgM. Por outro lado, as células B são capazes de reconhecer diretamente SARS-CoV-2 e apresentar os antígenos virais para linfócitos T helper para moléculas MHC de classe II que, então, contribuem na indução de macrófagos de tecido. Seguindo a resposta primária de IgM, a mudança de isotipo para IgG potencialmente pode levar a imunidade de longo prazo (Parikhani, et al, 2021).

Depois de identificar o RNA do vírus, a via de sinalização de cascatas de NF-kB e IRF-3 é ativada. Esses fatores de transcrição no núcleo iniciam a expressão gênica para citocinas inflamatórias e IFN-I, o que resulta na resposta inicial do sistema imunológico a um ataque viral. Enquanto a infecção viral é suprimida pela resposta imune primária, o SARS-CoV-2 utiliza mecanismos para escapar da resposta imune, incluindo a ubiquitinação e supressão dos sensores citosólicos de RNA (DAMPs) além de sua degradação. A falta de supressão do vírus durante uma resposta primária adequada leva à replicação e propagação viral, o que resulta na produção de grandes quantidades de INF-I, seguido por quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos nos pulmões, causando a síndrome da tempestade de citocinas (Parikhani, et al, 2021).

A resposta imune gerada por células Th1 tem um papel relevante na imunidade adaptativa contra infecções virais. As respostas das células T dependem principalmente da presença de APC's mediadas pelo microambiente da citocina. Células T CD8 citotóxicas são capazes de secretar um grupo de

moléculas como granzimas, perforina e IFN-g, que são essenciais na erradicação de células infectadas por vírus. As células T CD4 auxiliares facilitam a resposta adaptativa geral, auxiliando células T citotóxicas. Por outro lado, a imunidade humoral mediada por células B, desempenha um papel protetor, produzindo o anticorpo neutralizante e também impedindo a reinfecção por um período de tempo ainda pouco conhecido para SARS-CoV-2(Chatterjee et al.,2020).

O sistema complemento desempenha um papel ambíguo durante a infecção por SARS-CoV-2. Embora possa efetivamente contribuir para o controle dessa infecção em muitos indivíduos assintomáticos ou mesmo em pacientes com sintomas leves, a ativação do complemento também pode contribuir para várias patologias observadas em alguns dos pacientes graves, devido ao seu potente efeito pró-inflamatório (Amamura, T et al, 2021).

Segundo Holter et al. (2020), observou-se uma ativação sistêmica do sistema complemento em pacientes COVID-19 com níveis aumentados de C4d, C3bBbP, C3bc, C5a e sC5b-9. A concentração de sC5b-9 foi particularmente associada à insuficiência respiratória e inflamação sistêmica.

Por outro lado, dímeros de proteína N de três coronavírus (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) se ligam a MASP-2. Esta associação potencializa a interação de MBL, a autoativação de MASP-2 e subsequentemente ativação da via da lectina, levando à ativação descontrolada da cascata de complemento. Este mecanismo pode estar por trás da inflamação e patogênese observada em pacientes com COVID-19 (Gao, et al 2020).

Durante o curso da infecção, o sistema complemento pode ser ativado por meio de múltiplos caminhos pelo próprio vírus ou por tecidos danificados. A geração do C5a, cujos níveis são altamente elevados em pacientes sintomáticos (acompanhado por uma forte expressão de C5aR em monócitos e neutrófilos), aumenta a atividade do fator de tecido tanto na circulação como nas células endoteliais (Amamura, T et al, 2021).

A indução de P-selectina endotelial por C5a é importante para o recrutamento e agregação de plaquetas. Foi demonstrado que o C5a estimula a produção em excesso de armadilhas de neutrófilos extracelulares, que é pró-coagulante e captura plaquetas resultando em agregação plaquetária, formação de coágulos e trombos (Amamura, T et al, 2021).

Uma única partícula viral de SARS-CoV-2 pode gerar uma média de 100.000 cópias em 24 horas. No entanto, nosso sistema imunológico leva entre 15 e 21 dias para gerar uma resposta adequada contra o vírus. É composto por dezenas de bilhões de células altamente especializadas para localizar e destruir patógenos. É por isso que, na maioria dos casos, nossas defesas acabam vencendo a batalha contra o coronavírus(Montes,L 2022).

A primeira linha de resposta, após a primeira partícula viral ter entrado na célula, são os macrófagos, células que englobam os patógenos. Nesses primeiros momentos da infecção, também participam outras células chamadas de *natural killers*. Os lisossomos, organelas responsáveis pela degradação do material intracelular de origem externa, destroem o vírus. A proteína e os fragmentos de RNA do vírus servirão como antígenos, para que outros componentes do sistema imunológico (SI) saibam reconhecê-lo e neutralizá-lo(Montes,L 2022).

Se a infecção não for grave, os macrófagos serão suficientes para eliminá-la. Isso acontece na maioria das pessoas, razão pela qual o coronavírus não causa sintomas ou apenas sintomas leves em 80% dos casos. Se os macrófagos não conseguem derrotar o vírus, citocinas, proteínas que controlam a inflamação, são produzidas para ativar o sistema imune e aumentar a resposta antiviral. Interleucina-6 ou IL6, em particular, gera inflamação local. Isso ocasiona o aumento de diferentes biomarcadores como proteína C reativa, ferritina, D-dímero, entre outros, que permitem prever a gravidade da doença. Muitas das mortes por COVID-19 são devidas à “tempestade de citocinas” que acaba colapsando o sistema imunológico(Montes,L 2022).

As células *natural killer* (NK) ou *natural killers*, têm a missão de localizar e destruir células infectadas, portanto, as células NK não a reconhecem como sua e destroem a célula infectada(Montes,L 2022).

Na segunda linha de resposta, as células dendríticas são a engrenagem, entre a primeira e a segunda linha de resposta, essas células capturam os antígenos do vírus e os transportam pelo sistema linfático até os linfonodos, para serem apresentados aos demais membros do sistema imunológico. Essas células apresentam o vírus às células T auxiliares, que ajudarão outras células

a fazer seu trabalho, e às células B que encontram diretamente o vírus ou antígeno. Existem 10 bilhões de variantes de linfócitos B (Montes, L 2022).

Cada linfócito B tem um tipo específico de anticorpo, contra o vírus. Quando um linfócito B consegue se ligar ao vírus, por meio de uma proteína de seu invólucro externo, é onde ele produz anticorpos contra apenas uma partícula viral que encontra, é altamente específico. Esses linfócitos mais tarde se tornam plasmócitos que em sua grande maioria não circulam, mas secretam imunoglobulinas que circulam pelo sistema circulatório e, por fim, produzem anticorpos que inicialmente são imunoglobulinas M (IgM) e depois imunoglobulina G (IgG) (Montes, L 2022).

Estudos com anticorpos e células imunes são essenciais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, já que esses anticorpos inicialmente possuem ligações monovalentes e são anticorpos de baixa afinidade e avidéz (IgM), com o passar dos dias, semanas e meses esses anticorpos amadurecem, gerando uniões multivalentes produzindo maturidade, maior afinidade e avidéz (IgG). Portanto, os anticorpos produzidos inicialmente são IgM de alto peso molecular com baixa afinidade, enquanto os anticorpos produzidos posteriormente são de menor peso molecular, IgG com maior afinidade (Montes, L 2021).

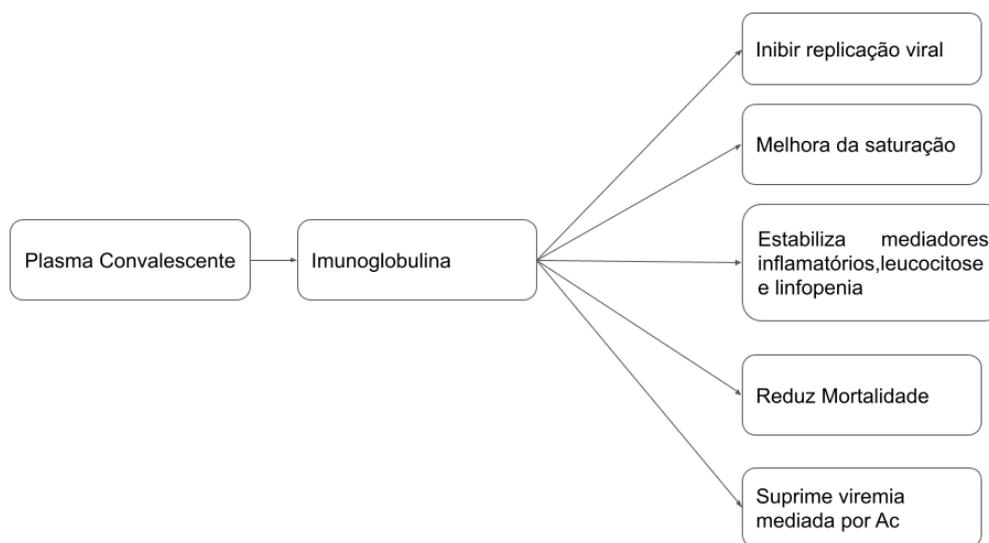
3.3 Plasma Convalescente e PLACOVID Trial

O plasma convalescente ou plasma imune é definido como o plasma coletado de indivíduos recuperados da doença. O tratamento com plasma convalescente fornece imunidade passiva de curto prazo a indivíduos suscetíveis e é ideal para a profilaxia pós-exposição contra a SARS-CoV-2 (Sharun et al, 2020).

Esta estratégia foi usada anteriormente, na pandemia de influenza A (H₁N₁) em 2009, influenza aviária A (H₅N₁), ebola em 2014, SARS-CoV em 2003 e MERS-CoV em 2012, no tratamento de sarampo, caxumba, poliomielite, gripe espanhola, varicela, escarlatina, varíola, febre de lassa entre outros. Seu uso em diferentes doenças virais mostra que realmente pode ser uma terapia efetiva. O plasma convalescente contendo anticorpos neutralizantes de vírus pode ser usado tanto como tratamento como profilaxia em indivíduos de alto risco, profissionais de saúde e indivíduos vulneráveis com quaisquer condições

médicas subjacentes. Os benefícios associados ao seu uso estão principalmente relacionados à supressão da viremia mediada por anticorpos (Roback, et al 2020; Sharun et al, 2020; Shen et al, 2020; Casadevall et al. 2020; Luke et al, 2010).

Figura 3.Benefícios do Plasma Convalescente



Fonte: Feito pela autora.

Segundo Tiwari (2020), o tratamento com plasma convalescente em casos de COVID-19 confirmados em laboratório foi associado à resolução de opacidades em vidro fosco, bem como consolidações pulmonares. Após a transfusão, um rápido aumento nos níveis de anticorpos neutralizantes é observado.

As transfusões de plasma podem resultar em eventos adversos relacionados à transfusão, incluindo reações transfusionais febris e alérgicas, dispneia associada à transfusão, reação hipotensiva, reações hemolíticas, reação séptica, lesão pulmonar aguda (TRALI) e sobrecarga circulatória associada à transfusão, sendo que a reação mais comum é a alérgica. A reação alérgica ocorre em menos de 5% das transfusões de hemoderivados, com um espectro de manifestações que varia de prurido leve e urticária a anafilaxia que requer hospitalização (Li et al. 2020; Huaman et al. 2023).

Um ensaio clínico (NCT04373460) com 1.181 pacientes (589 controles e 592 que recebem PC), 5.7% (n=68) dos eventos ocorreram durante a

transfusão, 4.6% (n=54) tiveram urticária ou prurido e 1.2% (n=14) descreveram como outras reações (Huaman et al. 2023).

O PLACOVID Trial (NCT04547660) foi um estudo clínico randomizado de fase 3 realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os pacientes arrolados foram randomizados para dois braços de estudo, intervenção ou grupo de controle, e os pacientes foram acompanhados durante 28 dias relativo aos resultados clínicos e laboratoriais, como melhora do estado da doença (medido por uma escala de gravidade ordinal de 6 pontos); ventilação mecânica, unidade de terapia intensiva (UTI) e período total de internação; níveis de citocinas (IL-6 e TNF- α) e vários parâmetros inflamatórios, de lesão celular e de coagulação. A intervenção era composta por duas infusões de 300 ml de plasma convalescente, com 2 dias de intervalo. O grupo de controle recebeu tratamento de suporte completo, similar ao grupo intervenção, exceto pelo uso do plasma convalescente.

3.4 Anticorpos neutralizantes

Os anticorpos neutralizantes (nAbs) têm a capacidade de se ligar e interferir na replicação viral independentemente da defesa celular imune do hospedeiro, além disso, inibem o crescimento viral em cultura de laboratório, enquanto os anticorpos de ligação podem não prevenir a infecção de células virais ou bloquear o crescimento viral em cultura. A severidade dos sintomas implica também no tempo de imunidade conferido pelos anticorpos neutralizantes. Os títulos para nAbs permanecem estáveis de 75 dias a 6 meses após o início dos sintomas em indivíduos convalescentes (Wendel, et al.; Galipeau et al, 2020).

Pacientes com COVID-19 desenvolvem anticorpos neutralizantes detectáveis no final da primeira semana da infecção e quase todos possuem anticorpos neutralizantes após 4 semanas de doença. A magnitude da resposta dos anticorpos e a proporção de respostas variam entre pacientes, havendo relatos que pacientes graves possuem títulos mais elevados de anticorpo neutralizante (Lau et al. 2021).

O reconhecimento pelas células T CD8 + de células virais infectadas e apoptóticas leva à fagocitose, contribuindo para a redução de danos pulmonares devido à tempestade de citocinas e recuperação mais rápida do paciente. Os anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2 são encontrados 2 a 3 semanas após a infecção, e não apresentam reação cruzada com SARS-CoV, sugerindo epítipo (s) diferente (s) da proteína S. Não está claro qual seria o título mínimo de anticorpos neutralizantes protetores, embora a maioria dos centros use uma faixa entre 80 e 160 (Wendel, et al.2020).

Os anticorpos IgG específicos são encontrados mais cedo no curso da infecção, com aumento progressivo e níveis permanentes após a infecção ter sido eliminada. Também é possível que os anticorpos neutralizantes detectados sejam direcionados contra as unidades S1 e S2, de forma semelhante ao SARS-CoV, sugerindo possíveis mecanismos alternativos de depuração viral. Além disso, não há prova de que os testes in vitro se correlacionam com a resposta clínica in vivo para SARS-CoV-2. Pode-se observar a persistência de anticorpos neutralizantes por pelo menos 2 anos antes do declínio. Entretanto, o anticorpo neutralizante anti-SARS-CoV-2 pode não se desenvolver em até 5% dos pacientes, e apenas 70% tinham títulos superiores a 500, com títulos mais altos em adultos e idosos (Wendel, et al.2020).

Ensaio de neutralização permitem uma avaliação crucial sobre a capacidade de neutralização do vírus e consequente probabilidade de proteção em subsequente exposição. Atualmente, os ensaios de neutralização mais confiáveis envolvem vírus SARS-CoV-2 vivos produzidos em cultura celular e, portanto, exigem que todos os procedimentos sejam realizados em uma instalação de Nível de Biossegurança 3(NB3) (Galipeau et al, 2020).

Os anticorpos neutralizantes têm a capacidade de bloquear a capacidade do vírus de se ligar ao receptor ACE2 nas células humanas, permitem eliminar o efeito dos microrganismos invasores, e sua atividade é gerada por proteínas localizadas na superfície dos vírus, às quais se ligam para “bloquear” a infecção(Montes,L 2022).

Diferentes estudos focados contra SARS-CoV-2 indicam que esses anticorpos aparecem cerca de duas semanas após o início da infecção e que seu pico máximo de atividade ocorreria entre 4 e 6 semanas. Mas não foi confirmado se todos os pacientes geram anticorpos neutralizantes, quais fatores determinam sua aparência e atividade e se seus níveis neutralizantes seriam suficientes para conferir proteção, pois os níveis são altamente variáveis e não são detectados entre 10 e 30 % dos pacientes, 50 a 70% têm atividade neutralizante média ou média/baixa e apenas uma minoria de pacientes, entre 1 a 5%, gera altos títulos de neutralização. Em suma, são anticorpos funcionais(Alcami,J 2020;Montes,L 2022).

No entanto, deve-se ter em mente que não é apenas sua atividade neutralizante, mas também a contribuição para a citotoxicidade celular, favorecendo o controle e melhora da doença; as metodologias que são o padrão ouro possuem uma sensibilidade que não é conhecida até o momento e devem ser otimizadas para aumentar sua sensibilidade,o fato de sua atividade neutralizante não ser detectada nos exames não quer dizer que o paciente não tenha esses anticorpos capazes de bloquear o vírus(Montes,L 2022).

Segundo Montes(2022),os testes para anticorpos neutralizantes podem ser divididos em 3 níveis:onde o primeiro nível são os testes padrão ouro, no segundo os pseudovírus e no terceiro os imunoenaios de alto rendimento.

No primeiro nível, são os testes padrão ouro, pois imitam o comportamento natural da infecção, onde células humanas ou similares expressam receptores ACE2, interagem com uma mistura de vírus SARS-CoV-2 vivo e soro humano com ou sem a presença de anticorpos neutralizantes.Esses métodos são demorados,caros e o profissional deve possuir alta habilidade técnica para seu desenvolvimento e interpretação. Os testes padrão ouro são: o teste de neutralização de redução de placa (PRNT), teste de neutralização de redução de foco (FRNT) e ensaio de microneutralização(Montes,L 2022).

Todos estes testes requerem um laboratório de Biossegurança Nível 3 (Biossegurança Nível 3 - NB3), testam a atividade neutralizante no soro ou

plasma através da incubação de uma preparação viral com o soro do paciente em várias diluições. O grau de infecção na ausência de soro e na presença das diferentes diluições de soro é comparado. A diluição com a qual 50% da infecção é inibida é chamada de concentração inibitória 50 e a diluição do plasma que a atinge é o título de neutralização(Montes,L 2022).

Essa diluição é conhecida como mediana da dose infecciosa de cultura de tecidos (TCID 50), que representa a dose infecciosa de cultura de tecidos de 50%. O TCID 50 é usado para quantificar os títulos virais determinando a concentração em que 50% das células infectadas apresentam um efeito citopático e a diluição única em que 50% das células apresentam a concentração efetiva média(EC), ele é usado para quantificar, em média, a quantidade de vírus presente na amostra original(Montes,L 2022).

No segundo nível, encontramos dois tipos de testes que mimetizam essa ligação entre o receptor ACE2 e a proteína S. São testes baseados em vírus pseudotipados e testes de neutralização com vírus substitutos. No caso de testes com pseudovírus, é gerado um vírus quimera, que consiste no núcleo de um vírus defeituoso recoberto por uma membrana que carrega a proteína S do SARS-CoV-2, e por meio de bioluminescência (fluorescência ou luciferase) que atuam como emissores de luz, podemos quantificar uma reação.Esses pseudovírus podem ser vírus da estomatite vesicular, lentivírus ou outros, onde a glicoproteína do envelope de outro vírus é integrada exogenamente e o genoma retém as características do vírus original. Eles são geneticamente modificados e abrigam um gene sinalizador que é determinado por um sistema de detecção(Montes,L 2022).

Esses testes incluem a neutralização de células vivas com base em pseudovírus processados em métodos com níveis de biossegurança mais baixos (Nível de Biossegurança 2 - NB2). Usando um vírus quimérico não patogênico, avirulento, que expressa a proteína de ligação à superfície do vírus de interesse (proteína S trimérica de SARS CoV-2). Eles são baseados em vetores de rbdovírus retrovirais, lentivirais ou recombinantes (vírus da estomatite vesicular). As leituras desses testes são baseadas em um sistema indicador incorporado no vírus quimérico, cujos exemplos incluem a expressão

de diferentes enzimas como a luciferase, proteína fluorescente verde e operon lacZ beta-galactosidase(Montes,L 2022).

Os sistemas indicadores permitem um menor tempo de resposta dos resultados. O sinal resultante pode ser detectado por luminometria, microscopia de fluorescência ou classificação de células ativadas por fluorescência. Os testes de neutralização baseados em pseudovírus continuam sendo métodos complexos associados a uma variabilidade analítica significativa e são difíceis de serem feitos na maioria dos laboratórios clínicos, devido à necessidade de manter culturas celulares e virais(Montes,L 2022).

Os ensaios de neutralização de primeiro e segundo nível são métodos complexos, com grande variabilidade analítica e de difícil implementação na maioria dos laboratórios clínicos devido à necessidade de manutenção de culturas celulares e virais, embora o segundo nível não seja tão exigente em biossegurança, temos testes de imunoensaio de alto desempenho (quimioluminescência, eletroquimioluminescência, ensaios de imunoabsorção enzimática – ELISA e imunofluorescência) que podem detectar anticorpos específicos de alto desempenho por ligação, contra domínios da proteína expressa em sua forma conformacional nativa(Montes,L 2022).

Atualmente, está sendo comercializado um tipo de bloqueio de imunoensaios de ligação (BoB) para a detecção de anticorpo neutralizante por ELISA, e esse desenho incorpora moléculas receptoras ACE2 humanas aderidas a uma fase sólida e com antígenos RBD de SARS-CoV -2 marcado com enzima. Este teste é conhecido como o Teste de Neutralização de Vírus Surrogate (sVNT)(Montes,L 2022).

Outros imunoensaios detectam anticorpos contra diferentes domínios, por exemplo, anti RBD, anti S1, anti S2, anti S, outros. Deve-se notar que em uma classificação de anticorpos contra SARS-CoV-2 realizada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças(CDC) dos EUA, inclui o único teste aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como um teste que detecta anticorpos neutralizantes funcionais(Montes,L 2022).

É crucial que os testes de imunoenensaio de alto rendimento sejam validados em sua fabricação, comparando-os com o padrão ouro para a detecção de imunoglobulinas G, que se correlacionam com a detecção de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2, realizada por exemplo com PRNT, microneutralização ou com o uso de pseudovírus. Portanto, esses testes devem ser validados com um número representativo de amostras para verificar suas concordâncias positivas ou negativas e especificidade para que sejam robustos e tenham um desempenho analítico aceitável em uso, com sensibilidade e especificidade aceitáveis (Montes, L 2022).

3.5 Testes de detecção de anticorpos contra SARS CoV-2

Os ensaios sorológicos para COVID-19 podem ser úteis em identificar a proporção de indivíduos expostos ao vírus em várias populações, de modo que a incidência possa ser monitorada; medir a soroprevalência em uma população para avaliar a prevalência da transmissão assintomática e fatores de risco para adquirir doenças entre outros. Ensaios sorológicos confiáveis, como ELISA e Quimioluminescência (CLIA), são necessários para determinar títulos de anticorpos e, mais importante, títulos de anticorpos neutralizantes e sua correlação com a imunidade ao SARS-CoV-2. As amostras biológicas utilizadas para esse tipo de teste são sangue, plasma, soro ou saliva para detectar múltiplos isotipos de anticorpos circulantes gerados pelos linfócitos B (Galipeau et al, 2020).

Os testes sorológicos são projetados para detectar a presença de anticorpos contra um determinado patógeno, neste caso, o SARS-CoV-2. Um resultado positivo é indicativo de uma exposição anterior a um ou vários dos epitopos antigênicos do patógeno e, portanto, não é um indicador de infecção ativa. Além disso, se o patógeno de interesse compartilha sequências de epitopos antigênicos com as proteínas de outros agentes ou mesmo de antígenos vacinais, o teste pode ser relatado como falso positivo (Galipeau et al, 2020).

No Brasil, o método sorológico tem sido o mais utilizado para diagnóstico da COVID-19, pelo custo e pela rapidez. Os kits de diagnóstico

disponíveis atualmente detectam a presença de anticorpos, IgA, IgM e IgG, que são proteínas específicas que expressam uma resposta imunológica do indivíduo frente ao contato com esse vírus. Os anticorpos começam a ser produzidos a partir do 7º dia da doença. Portanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de doença devido à janela imunológica (Nogueira J, et al. 2020).

Esse teste deve ser realizado a partir do oitavo dia de sintomas, para que seja considerado o tempo de produção de anticorpos pelo sistema imunológico em quantidade suficiente para detecção (Nogueira J, et al. 2020).

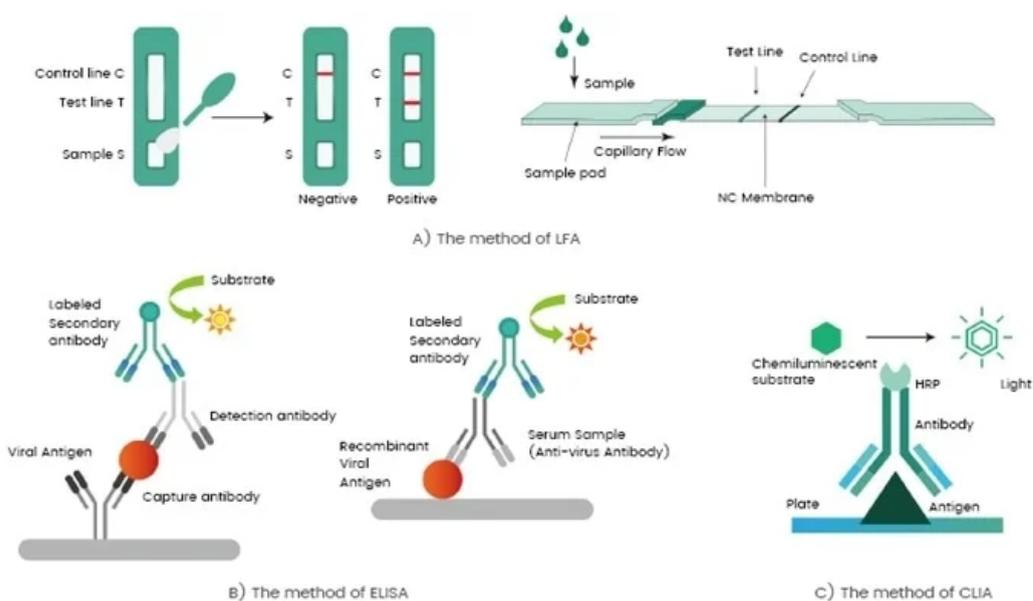
Segundo Nogueira et al (2020) existem atualmente quatro tipos principais de técnicas sorológicas para o diagnóstico da COVID-19 disponíveis no Brasil: sorologia IgM/IgG feita por quimioluminescência, sorologia IgA/IgG por ELISA, anticorpos totais por eletroquimioluminescência e algoritmo sorológico que pode ser feito por eletroquimioluminescência ou quimioluminescência.

3.5.1 Teste quantitativo para anticorpos IgG

A metodologia mais comumente utilizada é ELISA indireto (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), onde se procura na amostra do paciente a presença ou ausência dos anticorpos de interesse. Esse método possui alta sensibilidade e especificidade (Araujo et al,2000).

Os métodos mais comuns usados são ELISA em formato de placa de 96 poços e CLIA para instrumentos automatizados de alto rendimento. LFIA também está disponível para fornecer resultados rápidos. Não está claro se os anticorpos detectáveis em métodos de sorologia comerciais estão associados à proteção imunológica, pois são necessários grandes estudos em nível populacional e análises quantitativas de imunoglobulinas para avaliar se a detecção de imunoglobulinas específicas para SARS-CoV-2 se correlaciona com a proteção imunológica(Tali et al.,2021).

Figura 4.LFA,ELISA e CLIA



Fonte:Sino Biological Inc.

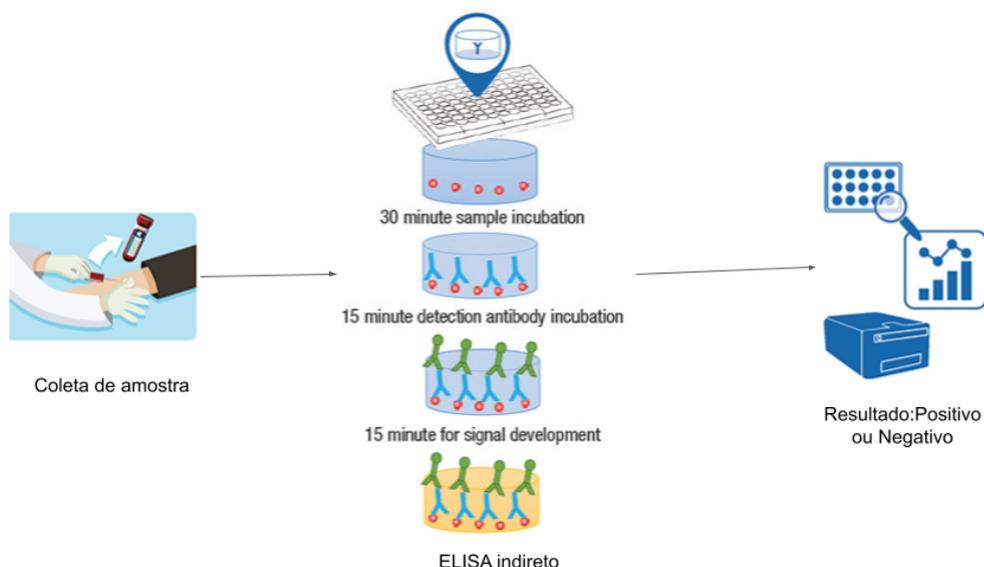
Ensaio sorológico detecta anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em fontes de sangue como soro, plasma ou sangue total (incluindo picadas no dedo e no calcanhar às vezes usadas em testes POC), e com a possibilidade de detecção de anticorpos em outros fluidos corporais, como saliva. Dado que o tempo típico necessário para detectar respostas imunes ao SARS-CoV-2 é de cerca de 1 a 2 semanas, os testes sorológicos têm utilidade limitada para o diagnóstico de SARS-CoV-2 nos estágios agudos da doença, mas podem ter valor uma vez que as respostas imunes tenham ocorrido. Apesar do acesso a ensaios sorológicos, a interpretação de seus resultados é ainda mais complicada na era pós-vacinal para SARS-CoV-2, e a relevância da detecção de anticorpos deve ser considerada no contexto em que é utilizada e suas limitações (Tali et al., 2021)

Os ensaios sorológicos geralmente usam antígenos recombinantes para capturar anticorpos específicos para SARS-CoV-2, sendo a proteína N e o domínio de ligação ao receptor (RBD) da subunidade S1 da glicoproteína S os antígenos mais usados. Os métodos sorológicos podem ter como alvo um ou mais isotipos de imunoglobulina (ou seja, IgA, IgM ou IgG) ou anticorpo total e, teoricamente, qualquer um desses isotipos pode fornecer atividade

neutralizante contra SARS-CoV-2. IgM e IgG são imunoglobulinas comumente usadas em ensaios sorológicos para SARS-CoV-2, enquanto a detecção de IgA é menos comumente usada (Tali et al., 2021)

O antígeno purificado fica aderido aos poços da microplaca de poliestireno (fase sólida). Em seguida, adiciona-se o plasma do paciente e, caso a amostra seja positiva, anticorpos específicos se ligam aos antígenos da fase sólida. Na segunda etapa, inclui-se um segundo anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), que é ligado ao conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima, ocorre a reação de cor. Os orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de plasma (Euroimmun).

Figura 5. ELISA Indireto



Fonte: Elaborado pela autora

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) podem ser categorizados em quatro tipos principais: sanduíche, direto, indireto e competitivo. Para a detecção de SARS-CoV-2, ELISA indiretos, indiretos modificados e sanduíche de antígeno duplo são os métodos mais comumente usados, com antígenos recombinantes SARS-CoV-2 (Tali et al., 2021).

O soro ou plasma do paciente é adicionado e, se presentes, anticorpos específicos para SARS-CoV-2 se ligam aos antígenos imobilizados. Após as etapas de lavagem, um anticorpo secundário é então adicionado que é específico para o isotipo alvo (ou seja, anti-IgM humana, anti-IgG humana ou anti-IgA humana)(Tali et al.,2021).

Este anticorpo secundário (ou conjugado) está ligado a um fluoróforo que pode gerar fluorescência ou conjugado a uma enzima para geração de sinal colorimétrico ou quimioluminescente após a adição de um substrato. Normalmente, são usados métodos colorimétricos nos quais a densidade óptica (OD) (ou seja, absorvância) da solução pode ser medida usando um espectrofotômetro e correlacionada com a concentração do desempenho dos anticorpos alvo(Tali et al.,2021).

Normalmente, o tempo de resultado para ELISA é de 1 a 5 horas e, mais recentemente, aplicações POC de ELISA para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 foram exploradas usando tecnologia de microfluídica(Tali et al.,2021).

Deve-se notar que alguns pacientes podem ser negativos para anticorpos no momento do teste, mas isso não exclui a atividade das células B de memória ou as respostas funcionais das células T com exposições subsequentes ao SARS-CoV-2. Alguns estudos argumentam que os métodos imunológicos também podem ser usados em estudos de soroprevalência para auxiliar nas investigações de surtos em andamento (para identificar casos além da janela detectável de NAATs), para determinar exposições anteriores de populações ao SARS-CoV-2 (por exemplo, profissionais de saúde ou a população em geral), ou para avaliar as taxas de ataque em populações ou áreas geográficas definidas(Tali et al.,2021).

As vantagens deste teste são: ensaios sensíveis podem ser desenvolvidos pela amplificação do efeito de enzimas; reagentes são relativamente baratos e podem ter um prazo de validade longo; múltiplos ensaios simultâneos podem ser desenvolvidos; ampla variedade de configurações de ensaios pode ser desenvolvida; equipamento pode ser barato e encontra-se amplamente disponível e não há risco de radiação durante a

marcação ou o descarte dos resíduos (Mcpherson, et al, 2012).

Já as desvantagens são: estimativa da atividade enzimática pode ser mais complexa que a da atividade de alguns tipos de radioisótopos; atividade enzimática pode ser afetada por constituintes plasmáticos; ensaios homogêneos no momento têm sensibilidade de $10^{-9}M$, não sendo tão sensíveis como os radioimunoensaios; foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos homogêneos para grandes moléculas de proteína, mas requerem reagentes imunoquímicos complexos (Mcpherson, et al, 2012).

3.5.2 Quimioluminescência

O ensaio de quimioluminescência é a reação química que envolve a oxidação de um agente quimioluminescente, utilizado em instrumentos sorológicos altamente automatizados e é conhecido por sua alta sensibilidade em comparação com outros ensaios sorológicos. Semelhante ao ELISA, variações de CLIA foram aplicadas para a detecção de anticorpos SARS-CoV-2, como métodos indiretos e sanduíche. A reação gera luz, pelo evento excitatório, e envolve o uso de substratos como ésteres de acridínio ou do oxalato de nitrofenil, luciferina-trifosfato de adenosina entre outros. Agentes oxidantes que podem ser utilizados nas reações são: peróxido de hidrogênio, hipoclorito e oxigênio. Já os catalisadores podem ser: fosfatase alcalina, peroxidase, microperoxidase, cobre, ferro e anel heme. A relação entre o sinal quimioluminescente e a concentração dos analitos é linear até sete ordens de variação dinâmica (Mcpherson, et al, 2012; Tali et al., 2021).

O CLIA tem duas diferenças principais dos ELISA colorimétricos. Primeiro, a reação final produz luz, que é detectada por um luminômetro em unidades relativas de luz (RLU) em vez do OD, que é um valor absoluto. Para produzir luz, o conjugado usa uma reação enzima-substrato, como os substratos de fosfatase alcalina (FAL) e Lumigen APS-5 (Tali et al., 2021).

Em segundo lugar, as microesferas magnéticas em uma reação em fase líquida em vez de placas multipoços são revestidas com os materiais antigênicos, o que permite a fácil separação de moléculas ligadas e não ligadas por um ímã e reações mais rápidas devido ao fornecimento de uma grande

área de superfície e permitindo que as reações ocorram totalmente em suspensão. Alguns CLIA foram comercializados e usados em analisadores automáticos de alto rendimento(Tali et al.,2021).

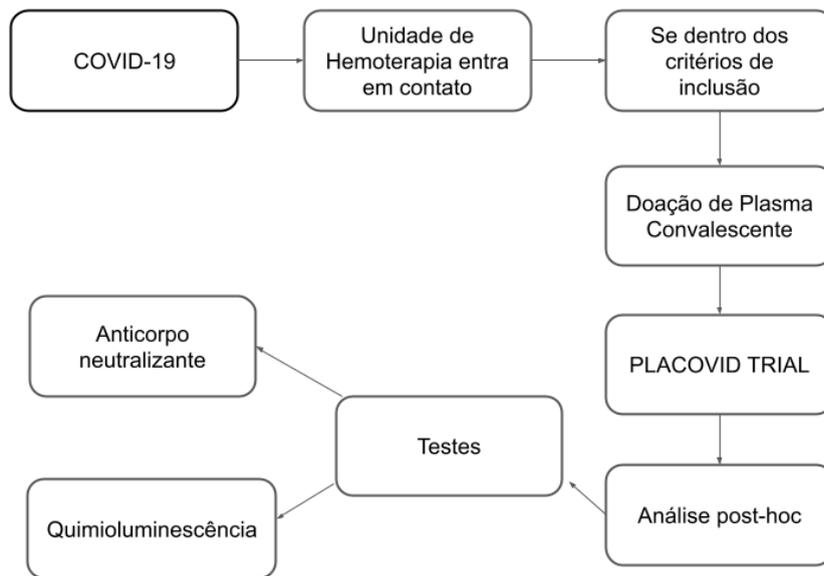
O ensaio SARS-CoV-2 IgG foi desenvolvido para detectar anticorpos da classe de imunoglobulinas G (IgG) contra a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em soro e plasma de pacientes com sinais e sintomas de infecção que estejam com suspeita de coronavírus (COVID-19) ou em soro e plasma de indivíduos que possam ter sido infectados pelo SARS-CoV-2 (Abbott, 2020).

O sistema imune do hospedeiro reage à infecção pelo SARS CoV-2 produzindo anticorpos específicos. Foi reportado que esses anticorpos aparecem no soro ou plasma de indivíduos infectados após a detecção do ácido ribonucleico (RNA) viral em swabs em cerca de alguns dias até 2 semanas após o início dos sintomas. Anticorpos IgG específicos contra o SARS-CoV-2 são detectáveis em pacientes com COVID-19 durante a fase sintomática da doença depois que o RNA não é mais detectável (Abbott,2020).

A sensibilidade da combinação dos resultados de RNA e de anticorpos foi reportada em >99%. A persistência de anticorpos IgG permite a identificação de pessoas que foram infectadas no passado, se recuperaram da doença e possivelmente se tornaram imunes. A detecção de IgG e outros testes sorológicos irão desempenhar um papel importante na pesquisa e na vigilância (Abbott, 2020).

4. MARCO CONCEITUAL

Figura 6.Marco Conceitual



Fonte:Elaborada pela autora

5. JUSTIFICATIVA

O crescente número de casos e pessoas afetadas pela pandemia de SARS-CoV-2, que já vitimou mais de 6.900.000 pessoas ao redor do mundo, segundo a OMS, já foram associadas a diversos desfechos clínicos. Considerando que se somam, segundo a OMS, mais de 750.000.000 de casos confirmados em todo o mundo, é importante e necessário que haja mais estudos que auxiliem na compreensão dessa doença. O presente projeto visa avaliar a performance diagnóstica de um teste de detecção de anticorpos para SARS-CoV-2 mais acessível do que a titulação de anticorpos neutralizantes e sua relação com desfechos de interesse.

5.1 Hipótese

5.1.1 Hipótese alternativa

Há correlação entre testes sorológicos (quimioluminescência) com anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2.

5.1.2. Hipótese nula

Não há correlação entre testes sorológicos (quimioluminescência) com anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Principal

Comparar metodologias de detecção e mensuração de anticorpos contra SARS-CoV-2 na tentativa de estabelecer um limiar de corte para identificar indivíduos com imunidade humoral protetora

6.2 Objetivos específicos

- Curva ROC para avaliar ponto de corte de índice de titulação(1:80 e 1:160) de nAbs
- Estimar índices de corte de quimioluminescência
- Correlação entre os testes nAbs e CLIA

- Associação entre índices medidos de anticorpos e dados do doador de plasma convalescente

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Delineamento da pesquisa

Estudo Retrospectivo Transversal

7.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos nesta pesquisa 48 doadores, com idade entre 18 e 60 anos. O estudo possuiu como pré-requisitos incluir doadores com diagnóstico de COVID 19 por RT-PCR conforme critérios da Organização Mundial de Saúde e/ou sorologia IgG confirmada para SARS-CoV-2 por ELISA ou quimioluminescência, ausência de sintomas há pelo menos 14 e preferencialmente menos de 40 dias do início dos sintomas, resultado de um segundo RT-PCR de swab nasal negativo, hemoglobina superior a 12,5 g/dL para mulheres (preferencialmente nulíparas) e 13,0 g/dL para homens. Além de todos os critérios de elegibilidade para doação de sangue conforme Portaria da Consolidação 5 do Ministério da Saúde de 28 de setembro de 2018 e RDC 34 de 11 de junho de 2014. Os doadores que consentiram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para fins éticos de comprovação do aceite.

7.3 Critérios de exclusão

Qualquer alteração, sob avaliação do médico hemoterapeuta, que pudesse colocar em risco o doador e/ ou receptor.

7.4 Tamanho e cálculo amostral

A amostra utilizada compreendeu doadores voluntários candidatos à doação de plasma convalescente qualificados a partir de um processo de seleção voluntária conduzido pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, em função de ser uma análise post-hoc, o

cálculo amostral foi relativo ao desfecho primário do estudo e não aos secundários. As doações de plasma ocorreram de Junho até Dezembro de 2020.

7.5 Descrição das metodologias de detecção de anticorpos utilizadas

7.5.1 Princípios Biológicos do teste SARS-CoV 2 IgG Abbott

Este ensaio é um imunoenensaio automatizado para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 em soro e plasma humanos utilizando a tecnologia do imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (CLIA).

A amostra, as micropartículas paramagnéticas revestidas de antígeno SARS-CoV-2 e o diluente do ensaio são combinados e incubados. Os anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 presentes na amostra ligam-se às micropartículas revestidas de antígeno SARS CoV-2. A mistura é lavada. O conjugado de anticorpos anti-IgG humana marcado com acridínio é adicionado para criar uma mistura de reação e incubado. Após um ciclo de lavagem, as Soluções Pré-Trigger e Trigger são adicionadas.

A reação quimioluminescente resultante foi medida em unidades de luz relativas (RLU). Há uma relação direta entre a quantidade de anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 na amostra e as RLU detectadas pela ótica do sistema. Essa relação reflete-se no Index (S/C) calculado. A presença ou ausência de anticorpos IgG contra o SARS CoV2 na amostra foi determinada pela comparação entre a RLU quimioluminescente da reação e a RLU do calibrador. Todos os procedimentos relacionados ao CLIA foram realizados no laboratório Hermes Pardini em Minas Gerais.

7.5.2 Anticorpo neutralizante

Os anticorpos neutralizantes (nAbs) foram determinados em amostras colhidas na data da doação de plasma convalescente. A titulação de nAbs foi realizada usando o teste de neutralização de vírus baseado em efeito citopático (VNT baseado em CPE) com vírus de cepa SARS-CoV-2 / humano / BRA / SP02cc / 2020 (número de acesso GenBank: MT350282. 1), seguindo o

protocolo previamente descrito em Wendel et al., 2020 (Araujo et al, 2020; Wendel et al, 2020).

Resumidamente, 5×10^4 células / mL de células Vero (ATCC CCL-81) foram semeadas 24 horas antes da infecção em uma placa de 96 poços. As amostras de soro foram, inicialmente, inativadas por 30 min a 56°C . Foram utilizadas 11 diluições (duas vezes) de cada soro (1:20 a 1: 20.480). Subsequentemente, o soro foi misturado vol / vol com 1000 TCID₅₀ / mL do vírus e pré-incubado a 37°C durante 1 hora para permitir a neutralização do vírus.

Em seguida, a mistura de soro mais vírus foi transferida para a monocamada de células confluentes e incubada por 3 dias a 37°C , sob 5% de CO₂. Após 72 horas, as placas foram analisadas diretamente com microscopia de campo claro de luz transmitida (Olympus Co. Tóquio, Japão).

O título de neutralização de vírus referido a VNT100 é descrito como a maior diluição de soro que neutralizou o crescimento do vírus (ausência de efeito citopático). Todos os procedimentos relacionados ao CPE-VNT foram realizados em laboratório de biossegurança nível 3, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, de acordo com as recomendações da OMS (OMS, 2020).

7.6 Riscos

O presente projeto não agregou novos riscos aos doadores uma vez que utilizou dados secundários do PLACOVID trial.

7.7 Benefícios

A partir da análise das variáveis organizadas, foi produzido um artigo científico com os resultados obtidos que contribuirá para um melhor entendimento da correlação entre os testes sorológicos e anticorpos neutralizantes para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2.

7.8 Aspectos éticos

Este é um projeto de pesquisa desenvolvido como parte integrante da Pós Graduação em nível de mestrado da aluna Gabriela Barella Schmidt. O projeto foi encaminhado para o Comitê de Bioética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foi aprovado sob número CAAE 57434622.0.0000.5327 e está em conformidade com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Trata-se de uma análise post-hoc de dados secundários do PLACOVID trial, dispensando-se a aplicação de novo TCLE. As identidades dos voluntários não serão reveladas, mantendo sigilo adequado ao comportamento científico. Não são conhecidos riscos pela participação no estudo. A participação nessa pesquisa não gerará custos ou ônus aos participantes, assim como não prevê nenhum tipo de pagamento.

O Projeto dispensa TCLE pelo fato de todas as análises já terem sido feitas nas amostras previamente coletadas durante o período do trial. Não há nenhuma repercussão diagnóstica e /ou prognóstica pelo fato de que os participantes apresentavam na época uma doença infecciosa que já estava curada no momento da coleta dos exames, portanto resultados posteriores não teriam repercussão, tanto positiva como negativa, diagnóstica e/ou prognóstica para esses pacientes.

7.8.1 Lei Geral de Proteção de Dados

Dispõe sobre o tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis. A forma de acesso aos dados foi feita pela consulta de banco de dados confeccionado com os dados de pacientes que participaram do PLACOVID trial. Os dados foram armazenados em planilhas de excel em computadores institucionais, no qual somente pessoas autorizadas poderiam ter acesso aos dados dessas planilhas.

7.9 Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas como média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico (conforme distribuição avaliada pelo teste de

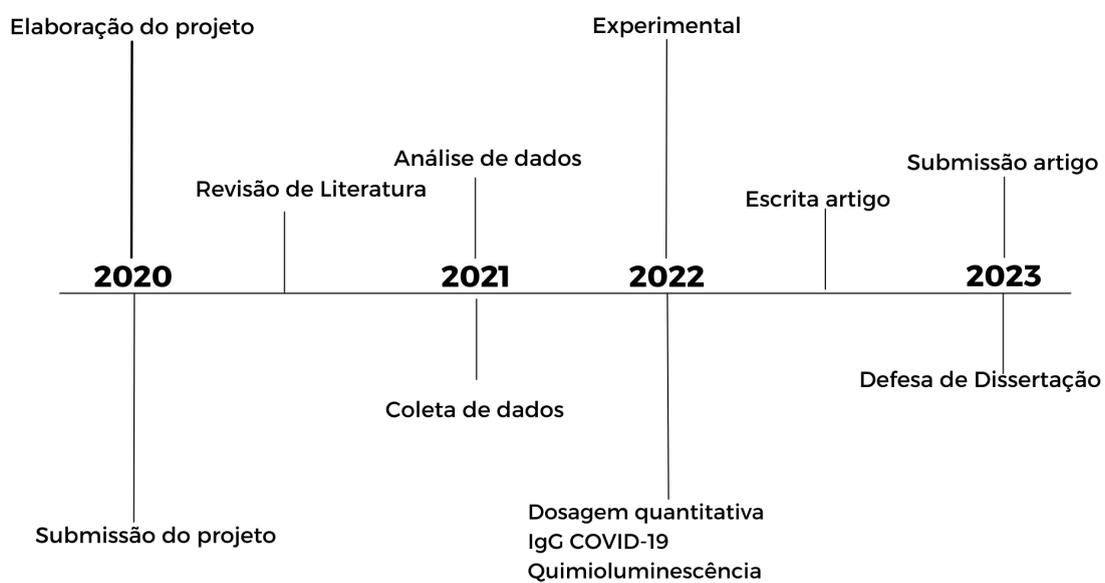
Shapiro-Wilk). As variáveis categóricas foram descritas como frequência absoluta e relativa. Variáveis contínuas foram comparadas através de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis. Variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado para k amostras independentes. A correlação entre os níveis de índice de CLIA e a titulação de anticorpos neutralizantes foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson ou Spearman conforme distribuição das variáveis. Uma curva ROC foi plotada considerando o índice medido por CLIA e títulos de anticorpos neutralizantes iguais ou superiores a 1:160. O nível de significância estabelecido foi de $P < 0,05$. O software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 23.0 foi utilizado para as análises estatísticas.

7.10 Local de realização

O projeto foi realizado no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

7.11 Cronograma

Para a realização do Projeto de Mestrado o cronograma de execução foi descrito a seguir.

Figura 7. Cronograma do projeto

Fonte:Elaborada pela autora.

7.12 Orçamento

Quadro 1 . Orçamento do projeto

Descrição do material	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Folhas A4	3 pacotes	R\$ 30	R\$ 90
Caneta azul	03	R\$ 2,50	R\$ 7,50
Impressão	160	R\$ 0,15	R\$ 24,00
Computador	2	R\$2.950	R\$5.900
Estatística	2	R\$ 600,00	R\$1,2000
Revisor	2	R\$80,00	R\$160,00
Total: R\$ 7.381,50			

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed-Hassan H; Sisson B; Shukla R; Wijewantha Y; Funderburg N; Li Z; Hayes D; Demberg T; Liyanage N. Innate Immune Responses to Highly Pathogenic Coronaviruses and Other Significant Respiratory Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 2020.

Alcamí, José. ISCIII | Grupo de Análisis Científico de Coronavirus del ISCIII (GACC-ISCIII). Anticuerpos neutralizantes frente a SARS CoV-2, 2020.

Araujo D; Machado R; Amgarten D; Malta F; Araujo G; Monteiro C et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020, v. 115.

Buogo, S; Sardenberg, L. Chefe da Organização Mundial da Saúde declara o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde global. Disponível em :<<https://brasil.un.org/pt-br/230307-chefe-da-organiza%C3%A7%C3%A3o-mundial-da-sa%C3%BAde-declara-o-fim-da-covid-19-como-uma-emerg%C3%AAnc ia-de-sa%C3%BAde>>. Acesso em 04/08/2023.

Casadevall A; Pirofski L. The convalescent sera option for containing COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*, 2020.

Chatterjee S; Saha S; Munoz M. Molecular Pathogenesis, Immunopathogenesis and Novel Therapeutic Strategy Against COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020.

Chen N; Zhou M; Dong X; Qu J; Gong F; Han Y et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020.

Euroimmun [homepage na internet].Técnica Elisa[acesso em 04 nov 2020]. Disponível em:<https://www.euroimmun.com.br/tecnicas/2/elisa#conteudo>

Galipeau Y; Greig M; Liu G; Driedger M; Langlois M. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, 2020.

Garcia I; Sintes H; Radua J; Capa J; Rosell A. D-dimer in patients infected with COVID-19 and suspected pulmonary embolism. *Respiratory Medicine*, 2020.

Gao T;Zhu L; Liu H; Zhang X; Wang T; Fu Y et al .Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct Target Ther*, 2022.

Goldsby R; Kindt T; Osborne B; Kuby J. *Kuby Immunology*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 162.

Gottlieb R; Nirula A; Chen P et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2021.

Huaman MA, Raval JS,Paxton JH, Mosnaim GS, Patel B, Anjan S, et al.Transfusion reactions associated with COVID-19 convalescent plasma in outpatient clinical trials.*Transfusion*, 2023.

Holter J; Pischke S; Boer E; Lind A; Jenum S; Holter A et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020.

Huang C; Wang Y; Li X; Ren L; Zhao J; Hu Y et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020.

Kriz C; Iman N; Zaidi, S. Breaking down COVID-19. *Publication of First Medicine and Global Clinical Partners*. [S.l.;s.n]{2020?}

Lau E; Tsang O; Hui D; Kwan M; Chan W; Chiu S et al. Neutralizing antibody titers in SARS-CoV-2 infections. *Nature Communication*, 2021.

Li D; Sempowski G; Saunders K; Acharya P; Haynes B. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. *Annu. Rev. Med*, 2022.

Liao M; Liu Y; Yuan J; Wen Y; Xu G; Zhao J et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. 2020. Artigo em pré-publicação.

Libster R; Pérez Marc G; Wappner D et al. Early high-titer plasma therapy to prevent severe Covid-19 in older adults. *N Engl J Med* ,2021.

Li L; Zhang W; Hu Y; Tong X; Zheng S; Yang J; Kong Y et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2020.

Liu J; Li S; Liang B; Wang X; Wang H; Li W et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020.

Liu F; Xu A; Zhang Y; Xuan W; Yan T; Pan K; Yu W; Zhang J. Patients of COVID-19 may benefit from sustained lopinavir-combined regimen and the increase of eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression. International Journal of Infectious Disease, 2020.

Lundgren J; Grund B; Barkauskas C et al. A neutralizing monoclonal antibody for hospitalized patients with COVID-19. N Engl J Med ,2021.

Luke T; Casadevall A; Watowich S; Hoffman S; Beigel J; Burgess T. Hark back: Passive immunotherapy for influenza and other serious Infections. Critical Care Medicine, 2010.

Lokugamage K; Hage A; Schindewolf C; Rajsbaum R; Menachery V. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. 2020. Artigo em pré-publicação: disponível em bioRxiv.

McPherson R; Pincus M. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry. 21. ed. Barueri, SP: Editora Manole; 2012.

Ministério da Saúde [homepage na internet]. Como é transmitido? [acesso em 07 dez 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido>

Ministério da Saúde [homepage na internet]. Sobre a doença [acesso em 03 nov 2020]. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca>

Montes, L. Neutralizing antibodies, new laboratory tests against SARS-CoV-2. Acta Médica Peruana, 2022.

Nogueira J; Silva, L. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2020.

Organização Mundial da Saúde. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). 2020

Organização Mundial da Saúde. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). 2021

Organização Mundial da Saúde[homepage na internet].WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard[acesso em 07 dez 2021].Disponível em :<https://covid19.who.int/>

Organização Pan-Americana da Saúde [homepage na internet]. Folha Informativa COVID-19[acesso em 03/11/20]. Disponível em:<https://www.paho.org/pt/covid19>

Parikhani A; Bazaz M; Bamehr H; Fereshteh S; Amiri S; Vaziri M et al. The Inclusive Review on SARS CoV-2 Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Potential Management Options. Current Microbiology, 2021.

Pereira M; Barros I; Jacob A; Assis M; Kanaan S; Kang H. Laboratory findings in SARS-CoV-2 infections:State of the art. Revista da Associação Médica Brasileira, 2020.

Roback J; Guarner J. Convalescent Plasma to Treat COVID-19 Possibilities and Challenges. JAMA, 2020.

Santiesteban-Lores L; Amamura T; Silva T; Midon L; Carneiro M; Isaac L et al. Double edged-sword - The Complement System during SARS-CoV-2 infection. Life Sciences, 2021.

SARS-CoV-2 IgG [Bula técnica]. ABBOTT, 2020.

Sharun K; Tiwari R; Yattoo I; Patel S; Natesan S; Dhama J et al. Antibody-based immune therapeutics and use of convalescent plasma to counter COVID-19: advances and prospects. Expert Opinion on Biological Therapy, 2020.

Shen C; Wang Z; Zhao F; Yang Y; Li J; Yuan J et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. JAMA. 2020.

Silva C; Ceia F; Tavares M. SARS-CoV-2 Immune Response: An Overview. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, 2020.

Tali S; LeBlanc J; Sadiq Z; Oyewunmi O; Camargo C; Nikpour B; Armanfard N; Sagan S; Jahanshahi-Anbuhia S. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. Clin Microbiol, 2021.

Task Force on Pulmonary Embolism, European Society of Cardiology. Guidelines on diagnosis and management of acute pulmonary embolism. European Heart Journal, 2000.

Tay M; Poh C; Rénia L; MacAry P; Ng L. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nat Rev Immunol, 2020 (in press).

Wan Y; Shang J; Graham R et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan:an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*,2020.

Wendel S; Kutner J; Machado R;Wendel R;Bub C;Fachini R et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. *Transfusion*,2020.

Wiersinga W; Rhodes A; Cheng A; Peacock S; Prescott H. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) A Review.*JAMA*, 2020.

Zheng H; Zhang M; Yang C; Zhang N; Wang X; Yang X et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*, 2020.

Zheng M; Gao Y; Wang G; Song G; Liu S; Sun D et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*,2020.

10.CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível comparar metodologias de detecção e mensuração de anticorpos contra SARS-CoV-2 e propor o ponto de cutoff de 3,5 de índice de quimioluminescência para IgG para o diagnóstico de níveis imunologicamente protetores de títulos de anticorpos, com uma sensibilidade superior a 60% e uma especificidade superior a 80%. A ampla disponibilidade, rapidez e acessibilidade viabilizada pelo teste em plataforma de quimioluminescência poderá auxiliar na verificação de soroprevalência para COVID-19 e na eficácia do processo de imunização em nível populacional, auxiliando na verificação da imunidade de rebanho.

Contudo, algumas limitações devem ser destacadas. Trata-se de uma análise post hoc de um ensaio clínico previamente realizado. Esse ECR foi unicêntrico, o que equivale a um número baixo de indivíduos arrolados (apenas 48 doadores que corresponderam a 91 doações de plasma convalescente no total). O número amostral reduzido pode comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos. O processo de coleta de dados e posterior tabulação em banco de dados não foi padronizada *a priori* na coleta da informação, o que gerou um tempo maior de análise a fim de achar os dados faltantes.

11.PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora tenhamos realizado a caracterização do comportamento sorológico contra o SARS-CoV-2, tanto em termos de título de anticorpos neutralizantes, quanto em termos de quimioluminescência, devemos considerar que é provável que esta relação possa sofrer flutuações ao longo de um intervalo mais longo de tempo de acompanhamento, em relação ao que tivemos em nosso estudo. Um determinado anticorpo, em teoria, passa a ter maior avidéz, ou seja maior afinidade contra seu antígeno alvo, à medida que o tempo passa desde a primo infecção, fato que potencialmente poderia mudar a forma como ambos os testes se correlacionam ao longo do tempo pós-infecção.

Por outro lado, sabe-se que, embora não tenha sido possível demonstrar tal comportamento em nossa amostra de doadores, a quantidade de anticorpos

parece reduzir-se ao longo dos meses após a infecção, podendo levar também a uma mudança nos níveis de correlação entre os testes. Ademais, em nossa amostra avaliamos apenas aqueles cuja soropositividade foi dada por infecção ativa, sendo que aqueles que o fazem por imunização ativa potencialmente também podem apresentar níveis de correlação diferentes entre os testes. Explorar tais estratos diferentes de pacientes deve ser mérito de futuros próximos, incluindo indivíduos com mais de um evento infeccioso ao longo de tempo para avaliar a magnitude da resposta anamnésica precipitada por estes anticorpos.

12.ANEXO

Stard Checklist

O Checklist foi preenchido de acordo com o número das páginas da dissertação, sendo a Capa a página um.

Section & Topic	Nº	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	1
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	4
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	15
	4	Study objectives and hypotheses	43
METHODS			
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	44
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	44
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	44
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	44
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	44
<i>Test methods</i>	10	Index test, in sufficient detail to allow replication	45
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	NA
	12	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index and reference tests, distinguishing pre-specified from exploratory.	45
	13	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers / readers of the index test; Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard.	NA

<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	47-48
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	NA
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	NA
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	NA
	18	Intended sample size and how it was determined	44
RESULTS			
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	72
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	73
	21	Distribution of severity of disease in those with the target condition, and distribution of alternative diagnoses in those without the target condition.	NA
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	NA
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	NA
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	69
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	46
DISCUSSION			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	81
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	81
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	59
	29	Where the full study protocol can be accessed	NA
	30	Sources of funding and other support; role of funders	NA