

ÉRIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO

Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2022

ÉRIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO

Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira Candido, Érika Donizetti

Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados / Érika Donizetti de Oliveira Candido; orientador Edison Luiz Durigon. - São Paulo, 2023.

154 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Covid-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Soroneutralização . 4. Anticorpos neutralizantes. 5. Isolamento Viral. I. Durigon, Edison Luiz , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato(a): Érika Donizetti de Oliveira Candido

Título da Tese: “Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados”

Orientador(a): Dr Edison Luiz Durigon

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:.....
Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

Pesquisador: ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39339920.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.656.486

Apresentação do Projeto:

Trata-se de reposta de pendência de projeto DESDE NOVEMBRO DE 2020

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de reposta de pendência datada de novembro de 2020

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Associados à coleta de material, sangue e swap conforme descrito no projeto

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto original mencionava utilização de amostras de pacientes positivos para SARCOV2 e carecia de um biorrepositório adequado uma vez que o apresentado contava com amostras de pacientes gerais aprovadas por este CEP para o Prof. Durigon. Foi solicitada organização deste material que estanho momento reorganizado. No entanto devemos levar em consideração o fato de que os pesquisadores so se lembraram de adequar o projeto após serem cobrados por este CEP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado adendo ao Biorrepositório conforme solicitado, carta reposta, justificativa para atraso, nova folha de rosto e cronograma

Recomendações:

Aprovar

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.656.486

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf	24/08/2022 10:33:12		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_ultima.pdf	24/08/2022 10:28:17	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_JUSTIFICATIVA_REGULAMENTO_BIORREPOSITORIO.pdf	24/08/2022 10:01:08	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	A3_Projeto_Detalhado.pdf	24/08/2022 09:42:03	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Outros	A4_Pedido_Adendo_Biorrepositorio.pdf	23/08/2022 17:18:30	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Folha de Rosto	A7_folhaDeRostocomassinaturas.pdf	23/08/2022 17:13:03	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Outros	Adendo_biorrepositorio2021.pdf	23/08/2022 14:58:38	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
Outros	autorizacao_biorrepositorio_Novo_Titulo.pdf	23/08/2022 14:50:37	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_VNT_Novo_Titulo.pdf	23/08/2022 14:21:17	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.656.486

Ausência	TCLE_VNT_Novo_Titulo.pdf	23/08/2022 14:21:17	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	Aceito
----------	--------------------------	------------------------	---	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Setembro de 2022

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Projeto de Pesquisa:
Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

Informações Preliminares

_____ **Responsável Principal** _____

CPF/Documento: 363.408.848-65	Nome: ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO
Telefone: 11983753488	E-mail: erikadonizetti87@gmail.com

_____ **Instituição Proponente** _____

CNPJ:	Nome da Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP
-------	--

É um estudo internacional? Não

■ **Assistentes**

CPF/Documento	Nome
004.242.028-83	Edison Luiz Durigon

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas

Título Público da Pesquisa: Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados

_____ **Contato Público** _____

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
363.408.848-65	ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO	11983753488	erikadonizetti87@gmail.com

Contato Científico: ERIKA DONIZETTI DE OLIVEIRA CANDIDO

Desenho:

Serão utilizadas amostras clínicas de pacientes com COVID-19 recebidas de hospitais colaboradores do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular. Estas serão tratadas com antibiótico/antifúngico e inoculadas em cultura celular (células VERO CCL). Serão utilizados soros de pacientes vacinados e não vacinados para fazer teste de neutralização viral contra cepa originária de Wuhan e variantes P.1, P.2 e outras que poderão surgir ao longo do curso para verificar se tais pacientes possuem anticorpos neutralizantes contra as cepas testadas.

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
				Financiamento Próprio

Palavra Chave

Palavra-chave
SARS-CoV-2
virologia

Detalhamento do Estudo**Resumo:**

Recentemente, no final de 2019, em Wuhan, província de Hubei, na China, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) da China relatou a detecção de um novo coronavírus (2019-CoV) causador de pneumonia de alguns casos dos pacientes de Wuhan. Em 11 de março de 2020 a OMS declarou que a COVID-19 representava uma pandemia. Desde então a COVID-19 continuou se espalhando pelo mundo. Segundo o Ministério de Saúde, no dia 27 de setembro, o Brasil contava com 4.717.991 pessoas que foram infectadas pelo SARS-CoV-2, destas, 141.406 vieram a óbito. Uma parte das pessoas infectadas não apresentam sintomas e são denominadas assintomáticas. Desde o surgimento do SARS-CoV-2 novas variantes têm aparecido em diversas partes do mundo. Embora este comportamento seja esperado, algumas destas variantes tem gerado preocupação mundial devido as vantagens evolutivas que o vírus possa ter adquirido. Como por exemplo, facilidade na propagação e principalmente a capacidade de escapar da proteção das vacinas disponíveis. Atualmente existem várias vacinas contra o vírus SARS-CoV-2 no mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, só 3 vacinas foram aprovadas pela ANVISA e têm sido aplicadas na população: AstraZeneca (Oxford), Coronavac (Sinovac) e Pfizer (BioNTech). Sendo que até hoje, foram aplicadas 81.540.602 doses, das quais 72% foram utilizadas como primeira dose e o restante como segunda. Embora a OMS não exija que os pacientes apresentem teste negativo para liberá-los do isolamento, trata-se de uma doença nova e ainda existem muitas incertezas sobre o assunto. Por tanto, se faz necessário realizar pesquisas voltadas para avaliação da viabilidade viral de amostras provenientes de pacientes sintomáticos e assintomáticos com diferentes períodos de infecção. Os resultados de pesquisas como esta, podem ajudar na formulação de estratégias sanitárias de contenção do vírus que auxiliariam na redução da taxa de transmissão viral na população. Tais estratégias são extremamente necessárias principalmente em lugares onde grande parte da população ainda não está vacinada. Além disso, atualmente tem circulado variantes de SARS-CoV-2 e é importante monitorar a população vacinada para verificar a proteção das vacinas não só contra variante B (Wuhan), mas também contra Gamma (P.1) e Zeta (P.2). Desta forma, a presente pesquisa, propõe determinar a viabilidade de vírus infeccioso, em cultura de células, a partir de amostras clínicas de pacientes sintomáticos e assintomáticos com diferentes períodos de infecção; determinar a porcentagem de soroconversão de indivíduos vacinados e determinar títulos de anticorpos neutralizantes contra diferentes variantes do vírus.

Introdução:

Os Coronavírus (CoVs) são da família Corona viridae. Possuem uma capa de gordura e proteína, genoma de RNA com fita simples de sentido positivo, ou seja, ele é utilizado diretamente para síntese proteica, assim a geração de novas cópias de partículas na célula infectada é acelerada. Entre as várias proteínas de superfície, está a proteína Spike, ou Proteína S, que é uma espícula glicoproteica que se liga fortemente à enzima ECA2 presente nas células que serão infectadas. A conformação destas proteínas ao redor do vírus se assemelha a uma coroa e por isso os coronavírus são nomeados assim. O genoma desse vírus possui aproximadamente 26 a 32 kilobases, sendo o maior genoma conhecido em vírus de RNA. A infecção por coronavírus em humanos raramente causam doenças graves, como síndrome respiratória aguda. Porém, em 2012 surgiu um coronavírus altamente patogênico que causava Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e no ano seguinte outro que gerava a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV). Desta forma, foi possível perceber que este grupo de vírus também pode causar doenças respiratórias graves em humanos. Devido à grande distribuição e alta prevalência dos coronavírus, assim como a grande diversidade genética e recombinação frequente de seus genomas, além do aumento da proximidade humano-animal, novos coronavírus podem surgir periodicamente. Recentemente, por exemplo, no final de 2019, em Wuhan, província de Hubei, na China, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) da China relatou a detecção de um novo coronavírus (2019-CoV) causador de pneumonia de alguns casos dos pacientes de Wuhan. Em 11 de março de 2020 a OMS declarou que a COVID-19 representava uma pandemia. Desde então a COVID-19 continuou se espalhando pelo mundo. Segundo o Ministério de Saúde, no dia 27 de setembro, o Brasil contava com 4.717.991 pessoas que foram infectadas pelo SARS-CoV-2, destas, 141.406 vieram a óbito. Uma parte das pessoas infectadas não apresentam sintomas e são denominadas assintomáticas. Embora seja difícil encontrar na literatura estatísticas que estimem com valores quantitativos a porcentagem de assintomáticos, se sabe que geralmente esses pacientes são mais jovens e podem ser mais socialmente ativos. E por esse fato, são uma fonte potencial de transmissão da doença complicando os esforços para manter a pandemia sob controle. No momento, não há tratamentos específicos para COVID-19, tampouco vacina disponível para toda a população mundial. No entanto, existem muitos ensaios clínicos em andamento avaliando tratamentos potenciais. Por tanto, é importante manter o isolamento para que o número de casos não continue a subir. Em 12 de janeiro de 2020 a OMS publicou a primeira orientação técnica sobre o manejo clínico do novo coronavírus. O paciente só era liberado do isolamento quando estava recuperado clinicamente e tivesse dois resultados seguidos de RT-PCR negativos no período de 24 horas de intervalo. Tal recomendação foi baseada nos conhecimentos e experiência com outros coronavírus, como os que causam SARS e MERS. Já em 27 de maio do mesmo ano, a OMS atualizou as orientações sobre os critérios para alta de pacientes do isolamento, pois acredita-se que apesar de resultado positivo no teste, provavelmente esses pacientes não são infecciosos, ou seja, não são capazes de transmitir o vírus para outra pessoa. Por tanto, o isolamento poderia ser interrompido obedecendo o seguinte critério: pacientes sintomáticos podem ser liberados após 10 dias do início dos sintomas, mais 3 dias adicionais sem sintomas. Já os assintomáticos estariam livres do isolamento 10 dias após o teste positivo para SARS-CoV-2. Segundo a OMS, a atualização destas recomendações foi baseada em estudos recentes e podem ser modificadas de acordo com novas evidências. Desde o

surgimento do SARS-CoV-2 novas variantes têm aparecido em diversas partes do mundo. Embora este comportamento seja esperado, algumas destas variantes têm gerado preocupação mundial devido as vantagens evolutivas que o vírus possa ter adquirido. Como por exemplo, facilidade na propagação e principalmente a capacidade de escapar da proteção das vacinas disponíveis. Como o surgimento do vírus SARS-CoV-2 é relativamente recente, até agora não existe uma unanimidade no tratamento de pacientes com COVID-19. Contudo, algumas pesquisas apresentam alternativas tanto no combate dos sintomas como estratégias que possam ajudar na inibição do vírus no corpo do paciente. Para combater a coagulopatia associada a COVID-19, por exemplo, existe a aplicação de anticoagulantes que tem gerado resultados positivos. Outras estratégias que tem mostrado bons efeitos são o uso de coquetel de antivirais, tratamentos com anticorpos monoclonais e terapia com plasma convalescente de pacientes recuperados. Atualmente existem várias vacinas contra o vírus SARS-CoV-2 no mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, só 3 vacinas foram aprovadas pela ANVISA e têm sido aplicadas na população: AstraZeneca (Oxford), Coronavac (Sinovac) e Pfizer (BioNTech). Sendo que até hoje, foram aplicadas 81.540.802 doses, das quais 72% foram utilizadas como primeira dose e o restante como segunda. Embora a OMS não exija que os pacientes apresentem teste negativo para liberá-los do isolamento, trata-se de uma doença nova e ainda existem muitas incertezas sobre o assunto. Por tanto, se faz necessário realizar pesquisas voltadas para avaliação da viabilidade viral de amostras provenientes de pacientes sintomáticos e assintomáticos com diferentes períodos de infecção. Os resultados de pesquisas como esta, podem ajudar na formulação de estratégias sanitárias de contenção do vírus que auxiliariam na redução da taxa de transmissão viral na população. Tais estratégias são extremamente necessárias principalmente em lugares onde grande parte da população ainda não está vacinada. Além disso, atualmente têm circulado variantes de SARS-CoV-2 e é importante monitorar a população vacinada para verificar a proteção das vacinas não só contra variante B (Wuhan), mas também contra Gamma (P.1) e Zeta (P.2). Desta forma, a presente pesquisa, propõe determinar a viabilidade de vírus infecciosos, em cultura de células, a partir de amostras clínicas de pacientes sintomáticos e assintomáticos com diferentes períodos de infecção; determinar a porcentagem de soroconversão de indivíduos vacinados e determinar títulos de anticorpos neutralizantes contra diferentes variantes do vírus.

Hipótese:

Embora alguns estudos afirmem que o vírus deixa de ser infeccioso após certa quantidade de dias de infecção, trata-se de uma doença nova e ainda existem muitas incertezas sobre o assunto. Por tanto, se faz necessário realizar pesquisas voltadas para avaliação da viabilidade viral de amostras provenientes de diferentes tipos de pacientes (sintomáticos e assintomáticos) com diferentes tempos de infecção. Com a circulação de variantes de SARS-CoV-2 e é importante monitorar a população vacinada para verificar a proteção das vacinas não só contra variante B (Wuhan), mas também contra Gamma (P.1) e Zeta (P.2). Isso porque algumas variantes podem escapar da proteção das vacinas disponíveis.

Objetivo Primário:

Realizar teste de Neutralização Viral – VNT de soros proveniente de pacientes vacinados e não vacinados. A técnica será realizada contra cepa original identificada em Wuhan, variante P.1, P.2 e outras variantes que possam aparecer até o término do curso.

Objetivo Secundário:

Isolar SARS_CoV_2 proveniente de amostras de pacientes sintomáticos e assintomáticos com diferentes períodos de infecção; Cultivar células Vero e Inocular amostras positivas para SARS_CoV_2; Observar e descrever efeito citopático gerados pelo vírus inoculado em cultura celular; Confirmar a infecção pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Metodologia Proposta:

Cultivo celular de VeroA linhagem Vero é proveniente de rim epitelial de células de macaco verde africano. Neste trabalho, são utilizadas células Vero E6 que são suscetíveis a infecção por SARS_CoV_2. São cultivadas com meio EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium), 10% de soro bovino fetal (FBS-Cultilab), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma®) e 1% de piruvato de sódio (Sigma®). Inoculação de SARS-CoV-2 em células Vero A inoculação ocorre após a remoção do meio. A monocamada da cultura de células é lavada duas vezes com PBS, seguido da adição de 150L da amostra (previamente tratada com antibióticos e antifúngicos). O mesmo procedimento é seguido com controles negativos, mas usando meio de manutenção (EMEM com 2% FBS). As placas contendo as células são incubadas a 37°C por 1 hora para adsorção do vírus. Após esse período, em cada orifício é adicionado 1000 L de EMEM contendo 2% de soro fetal bovino e incubados a 37°C. Posterior à inoculação, a cultura é observada diariamente para a constatação de efeito citopático (CPE) e o material é coletado para armazenamento e extração / qPCR após 5 dias de incubação. Extração de ácido nucleico é RT-qPCR em tempo real para detecção de vírus Para realizar a identificação do SARS-CoV-2, a extração do ácido nucleico total (RNA e DNA) das amostras coletadas é realizada utilizando a plataforma semiautomática NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, França), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras são manipuladas no Laboratório de biossegurança exigida para o novo coronavírus (2019-nCoV) pela OMS nas instalações do BLS3 do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A detecção do RNA viral é realizada usando o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems Inc., EUA) em uma máquina de PCR em tempo real ABI 7500 SDS (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha), usando sequência de primers e sonda para o gene E. As cópias de RNA / mL são quantificadas por RT-qPCR em tempo real usando um padrão específico de quantificação de RNA transcrito in vitro.

Critério de Inclusão:

Coleta de sangue: Idade maior de 18 anos; Sexo feminino e masculino; Vacinado contra COVID-19; Não vacinado contra COVID-19 (pré-vacina).

Critério de Exclusão:

Coleta de sangue: Idade menor de 18 anos.

Riscos:

O presente projeto não gera nenhum tipo de risco aos pacientes participantes. Existe apenas um desconforto durante a coleta onde é utilizado um Swab ou Aspirador de Nasofaringe.

Benefícios:

Os resultados de pesquisas com esta podem ajudar na formulação de estratégias sanitárias de contenção do vírus e ajudariam a reduzir a taxa de transmissão viral na população. A pesquisa irá avaliar a resposta imune de pacientes vacinados e não vacinados contra algumas cepas de SARS-CoV-2.

Metodologia de Análise de Dados:

Os dados serão analisados com o auxílio dos softwares GraphPad e MedCalc.

Desfecho Primário:

Estima-se que seja possível isolar SARS_CoV_2 de diferentes tipos de amostras; Espera-se que pessoas vacinadas contra COVID-19 apresentem anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2.

Tamanho da Amostra no Brasil: 1.341

Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	1.341

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Não

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

688

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Pacientes	688	Coleta de sangue e informações sobre vacinação e histórico de COVID-19

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Sim

Justificativa:

Para os experimentos relacionados com soroneutralização será necessária coleta de sangue e informações sobre a vacinação e histórico de COVID-19 prévia, por isso, antes da coleta de sangue os indivíduos receberão TCLE com informações sobre a pesquisa e irão concordar ou não com a participação no projeto.

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Sim

Justificativa:

Após a realização do teste de diagnóstico/sorológico, poderá haver sobra desse material que iremos armazenar para futuras pesquisas caso o participante concorde. Todo material será identificado apenas com um código (o nome do participante não será utilizado) e não poderá ser vendido nem utilizado para fazer produtos comerciais. Caso a amostra venha ser utilizada no futuro, o pesquisador apresentará um novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Comitê de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. O material biológico obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde que regulam o armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas, e poderá ser armazenado por até 10 anos (Resolução 441/2011).

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Inoculação SARS-CoV-2	24/08/2022	30/09/2022
Extração e qPCR	24/08/2022	30/09/2022
Elaboração da dissertação	24/08/2022	30/09/2022
Publicações	24/08/2022	10/10/2022
Cultivo celular	24/08/2022	10/10/2022
Análise de resultados	24/08/2022	30/09/2022
Neutralização Viral	24/08/2022	30/09/2022

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Despesas com materiais e Reagentes	Outros	R\$ 60.000,00
Total em R\$		R\$ 60.000,00

Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador:

O presente Projeto teve o título alterado devido a sugestão da banca durante a qualificação do Doutorado Direto. Com a mudança de nível de mestrado para doutorado, a avaliação imune humoral se tomou o foco principal da pesquisa. Por tanto houve a necessidade de adequar o título para deixá-lo mais claro e objetivo.

Bibliografia:

-Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., ... & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. Trends in microbiology, 24(6), 490-502. -European Centre for Disease Prevention and Control. (Jan 2020). Rapid Risk Assessment: Cluster of pneumonia cases caused by a novel coronavirus, Wuhan, China, 2020. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-cluster-pneumonia-cases-caused-novel-coronavirus-wuhan>. -Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., Van Der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., ... & Berger, A. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. New England journal of medicine, 348(20), 1967-1976. -Peiris, J. S. M., Lai, S. T., Poon, L. L. M., Guan, Y., Yam, L. Y. C., Lim, W., ... & Cheng, V. C. C. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. The

Data de Submissão do Projeto: 24/08/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf

Versão do Projeto: 2

Lancet, 361(9366), 1319-1325. -Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820. -Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Niu, P. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. -Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. -Liu, Y. C., Kuo, R. L., & Shih, S. R. (2020). COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical journal*. -Johns Hopkins University (sep 2020). Cumulative Cases By Days Since 50th Confirmed Case. Johns Hopkins University. <https://coronavirus.jhu.edu/data/cumulative-cases>. -Ministério de saúde do Brasil (sep 2020). Covid-19 no Brasil. Ministério de saúde. https://susanalitico.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html -World Health Organization. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 73 -Liu, J., Liao, X., Qian, S., Yuan, J., Wang, F., Liu, Y., ... & Zhang, Z. (2020). Community transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Shenzhen, China, 2020. -Ge, Z. Y., Yang, L. M., Xia, J. J., Fu, X. H., & Zhang, Y. Z. (2020). Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 1-8. -Lechien, J. R., ChiesaEstomba, C. M., Place, S., Van Laethem, Y., Cabaraux, P., Mat, Q., ... & Barillari, M. R. (2020). Clinical and epidemiological characteristics of 1,420 European patients with mild to moderate coronavirus disease 2019. *Journal of internal medicine*. -Pritchard, M., Dankwa, E., Hall, M., Baillie, J. K., Carson, G., ... & Merson, L. (2020). ISARIC COVID-19 clinical data report: 4 October 2020. *medRxiv*. -Kronbichler, A., Kresse, D., Yoon, S., Lee, K. H., Effenberger, M., & Shin, J. I. (2020). Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis. *International journal of infectious diseases*, 98, 180-186. -Centers for Disease Control and Prevention (sep 2020) People with Certain Medical Conditions. CDC. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html> -Centers for Disease Control and Prevention (sep 2020) COVID-19 Hospitalization and Death by Age. CDC. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-data/investigations-discovery/hospitalization-death-by-age.html> -World Health Organization. Coronavirus. (sep 2020). Coronavirus . WHO. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1 -World Health Organization. Coronavirus. (jul 2020). Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/criteria-for-releasing-covid-19-patients-from-isolation>

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Parecer Anterior	A10_PB_PARECER_RELATOR_4397983.pdf
Outros	autorizacao_biorrepositorio.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido_Novo_titulo.pdf
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Outros	A4_Pedido_Adendo_Biorrepositorio.pdf
Cronograma	Cronograma.pdf
Outros	A9_CARTA_RESPOSTA_atual.pdf
Comprovante de Recepção	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1649359.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf
Outros	autorizacao_biorrepositorio.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_JUSTIFICATIVA_REGULAMENTO_BIORREPOSITORIO.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAOJUSTIFICATIVAREGULAMENTOBIORREPOSITORIOcompressed.pdf
Outros	autorizacao_biorrepositorio.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_JUSTIFICATIVA_REGULAMENTO_BIORREPOSITORIO_Novo_Titulo.pdf
Cronograma	Cronograma.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4874494_E3.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf
Outros	CARTARESPOSTAASPENDENCIASPB.pdf
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf
Cronograma	Cronograma.pdf
Outros	CARTA_RESPOSTA_ultima.pdf

Data de Submissão do Projeto: 24/09/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf

Versão do Projeto: 2

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCompressed.pdf
Outros	CARTARESPOSTAASPENDENCIASPB.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	A3_Projeto_Detalhado.pdf
Cronograma	Cronograma.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_VNT_Novo_Titulo.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Outros	autorizacao_biorrepositorio.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCompressed.pdf
Brochura Pesquisa	Projeto_Detalhado_Erika_Candido.pdf
Outros	autorizacao_biorrepositorio_Novo_Titulo.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAOJUSTIFICATIVAREGULAMENTOBIORREPOSITORIOcompressed.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf
Folha de Rosto	A7_folhaDeRostocomassinaturas.pdf
Cronograma	Cronograma_Novo_Titulo.pdf
Outros	Adendo_biorrepositorio2021.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCompressed.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1649359.pdf
Cronograma	Cronograma.pdf

Finalizar

Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: Não

*... A minha família e amigos por toda ajuda,
paciência e apoio durante essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Izabel e Joaquim pela compreensão por todas as minhas ausências e pelo incentivo. Ao meu irmão Felipe e cunhada Amanda por terem tornado essa trajetória mais divertida e por todo o encorajamento. Ao meu marido Diego Armando por toda ajuda, parceria, companheirismo, incentivo e paciência.

Ao ilustre orientador dr. Edison Luiz Durigon pela confiança e oportunidade. A amiga e muitas vezes coorientadora, Danielle Bruna pela ajuda profissional, ensinamentos e pela linda amizade construída. À Edmarcia Elisa pela ajuda, conselhos e aprendizado.

À senhora Renata Frauendorf pela ajuda e apoio, principalmente durante fases tão difíceis. Aos amigos e colegas da EMEI Padre Mauro Baptista e CEI Parque Regina pelas palavras de coragem e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular - LVCM que de alguma forma puderam contribuir para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos amigos que contribuíram não só profissionalmente, mas fizeram um papel fundamental para tornar a caminhada mais leve e alegre. Agradeço por todos os momentos que compartilhamos, as palavras de carinho nas horas difíceis e toda a dedicação e ajuda com os experimentos de laboratório.

Muita gratidão à equipe do VNT: Guilherme, Isabela, Ralyria e Fabyano por todo o empenho, ajuda de extrema importância e apoio emocional. Também agradeço a equipe de cultura de células Camila e Vanessa. Gratidão à equipe de coleta, Camila Soares, Cairo e Thiane, pela grande ajuda e contribuição. Agradeço ao Rafael pelo treinamento e por toda ajuda mesmo estando tão longe. Em nome de todos do LVCM agradeço à Paloma que desempenhou seu trabalho com muita dedicação e carinho.

Agradeço por todo o aprendizado que a pós graduação me proporcionou e pelos vínculos construídos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) pelo suporte financeiro.

Agradeço ao Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

*“O papel dos infinitamente pequenos na
natureza é infinitamente grande”*

(Louis Pasteur)

RESUMO

CANDIDO, E.D.O. **Avaliação da resposta imune humoral contra a cepa ancestral e variantes Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados.** 2022. 154f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A história da humanidade tem tido episódios de doenças infecciosas que aumentaram significativamente as taxas de mortalidade, perturbando social e economicamente grandes comunidades e tendo impactos duradouros. Geralmente, estas doenças são causadas por agentes infecciosos microscópicos. O mundo já presenciou várias pandemias no decorrer da história. O maior problema é que a humanidade nunca esteve completamente preparada para a chegada de uma pandemia. O desconhecimento sobre a doença, patógeno e a reação da população em relação aos eventuais tratamentos, vacinas e estratégias que mitiguem o impacto do agente etiológico podem ser considerados fortes dificultadores para o manejo da situação. Por esses motivos, é necessário tempo hábil para entender o contexto, avaliar riscos e formular protocolos sanitários. Por isso, o desenvolvimento dessa pesquisa tem como objetivos contribuir com informações relevantes sobre o período de transmissão de pacientes com Covid-19 por meio da pesquisa de vírus viável em amostras de pacientes com a doença; avaliar a resposta imune humoral de indivíduos que receberam até três doses de vacina contra a Covid-19; analisar resultados obtidos com a neutralização viral levando em conta a faixa etária, dose de vacina, tempo após vacinação, variante do SARS-CoV-2 e histórico de Covid-19. Para isso, foram coletadas amostras de pacientes com Covid-19 em diferentes períodos da infecção e pesquisada a presença de vírus viável. Também foram coletadas amostras de soro de pacientes vacinados contra a doença para a realização dos testes de soroneutralização. Com os resultados obtidos foi possível concluir que o vírus SARS-CoV-2 pode ser isolado de amostras coletadas de *swab* nasal; pacientes infectados podem transmitir o vírus por até 39 dias após o início da infecção; a vacinação gera títulos de anticorpos neutralizantes, mas estes diminuem com o passar do tempo; os títulos de anticorpos neutralizantes de um voluntário varia de acordo com a variante analisada e por esse motivo, a presente tese fornece resultados que servem de base para as constantes atualizações das vacinas disponíveis.

Palavras-chave: Covid-19, SARS-COV-2, Soroneutralização, CPE-VNT, Anticorpos neutralizantes, Isolamento Viral.

ABSTRACT

CANDIDO, E.D.O. **Evaluation of the humoral immune response against the ancestral strain and Gamma, Delta and Omicron variants of SARS-CoV-2 in vaccinated individuals.** 2022. 154f. Ph. D. these (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Human history has had episodes of infectious diseases that have significantly increased mortality rates, socially and economically disrupting large communities and having lasting impacts. Generally, these diseases are caused by microscopic infectious beings. The world has witnessed several pandemics throughout history. The biggest problem is that humanity was never fully prepared for the arrival of a pandemic. The lack of knowledge about the disease, pathogen, and the reaction of the population about possible treatments, vaccines, and strategies that mitigate the impact of the etiological agent can be considered strong obstacles to the management of the situation. For these reasons, time is needed to understand the context, assess risks and formulate health protocols. Therefore, the development of this research aims to contribute relevant information about the period of transmission of patients with Covid-19 through the research of viable virus in samples of patients with the disease: assess the humoral immune response of individuals who received up to three doses of vaccine against Covid-19; analyze results obtained with viral neutralization considering age group, vaccine dose, time after vaccination, SARS-CoV-2 variant, and Covid-19 history. For this, samples were collected from patients with Covid-19 at different periods of infection and searched for the presence of the viable virus. Serum samples were also collected from patients vaccinated against a disease to perform the serum neutralization tests. With the results obtained, it was possible to conclude that the SARS-CoV-2 virus can be isolated from samples collected from nasal swabs; Infected patients can transmit the virus for up to 39 days after the onset of infection; the titers vary in relation to the analyzed variant and for this reason, there is a need to update the vaccines.

Keywords: Covid-19, SARS-COV-2, Seroneutralization, Neutralizing Antibodies, CPE-based VNT, Viral Isolation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variantes que mais preocuparam a OMS devido ao efeito significativo de propagação. São consideradas VOCs quando por meio de uma avaliação comparativa, demonstrou estar associada a uma ou mais alterações em um grau de significância para a saúde pública global. Na tabela é possível consultar o nome (letra grega), linhagem, país onde foi documentada e data da documentação.	43
Tabela 2 – Variantes de interesse: genoma com mutações que mudem o fenótipo do vírus e que foram identificadas como responsáveis pela transmissão comunitária, de múltiplos casos de Covid-19 ou que foram detectadas em vários países. Na tabela é possível consultar o nome (letra grega), linhagem, país onde foi documentada e data da documentação.	43
Tabela 3 – Relação entre idade e a possibilidade de hospitalização e morte por Covid-19. A faixa etária base para comparação são de pessoas entre 18 e 29 anos.	49
Tabela 4 – Distribuição das amostras de acordo com armazenagem, coleta e resultado de qPCR	62
Tabela 5 – Re-coletas positivas e indetectáveis isoladas em cultura de células. Na primeira coluna há a identificação da amostra; segunda coluna período mínimo infecção, ou seja, número de dias entre a primeira coleta/ou início dos sintomas e a re-coleta isolada; na terceira há o <i>Ct</i> da amostra clínica; na quarta é apresentado o <i>Ct</i> da primeira cultura de célula (T0); e quinta mostra o <i>Ct</i> da passagem (T1), quando houve. Abreviações: NR - não realizado.....	63
Tabela 6 – Características da amostragem: sexo, faixa etária, histórico de Covid-19, histórico de vacinação, número de doses.	69
Tabela 7 – Distribuição de amostras de acordo com o histórico de vacinação	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoV – Coronavírus

SARS-CoV – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

MERS-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome*

OMS – Organização Mundial de Saúde

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019* (do inglês)

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

LVCM – Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

MCTI – Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação

VNT – *Virus neutralization test* (do inglês)

MIS-C – *Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*

HE – Hemaglutinina esterase

RNA - Ácido Ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

S – *Spike*

E - Proteína de envelope

M - Proteína de matriz

N - Proteína do nucleocapsídeo

ACE-2 - Enzima conversora de angiotensina 2

RE - Retículo endoplasmático

TMPRSS2 - Protease transmembrana tipo 2

VOI – *Variant of Interest*

VOC - *Variant of Concern*

RT - Transcriptase reversa

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

ISARIC - Consórcio Internacional de Infecções Respiratórias Agudas e Emergentes Graves

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>24</u>
<u>2. REVISÃO DA LITERATURA</u>	<u>27</u>
2.1. HISTÓRICO.....	27
2.2. CLASSIFICAÇÃO, ORGANIZAÇÃO DO GENOMA E REPLICAÇÃO DOS CORONAVÍRUS.....	34
2.3. DIFERENTES VARIANTES DE SARS-CoV-2	42
2.4. PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	44
2.5. SINTOMAS E TRANSMISSÃO.....	46
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>51</u>
3.1. OBJETIVO GERAL	51
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
<u>4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....</u>	<u>52</u>
4.1. AMOSTRAGEM <i>SWAB</i> – ISOLAMENTO VIRAL.....	52
4.2. AMOSTRAGEM DE SORO – NEUTRALIZAÇÃO VIRAL	52
4.3. MANUTENÇÃO DE CULTURA CELULAR E ISOLAMENTO DE SARS-CoV-2.....	53
4.4. EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO E RT-qPCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO SARS-CoV-2	54
4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....	55
4.6. NEUTRALIZAÇÃO POR EFEITO CITOPÁTICO (CPE-VNT)	55
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E ORGANIZAÇÃO DOS GRÁFICOS.....	58
<u>5. RESULTADOS.....</u>	<u>59</u>
5.1. ISOLAMENTO VIRAL A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS.....	59
5.2. EFEITO CITOPÁTICO, CINÉTICA DE SARS-CoV-2 E IMUNOFLUORESCÊNCIA	64
5.3. NEUTRALIZAÇÃO POR EFEITO CITOPÁTICO (CPE-VNT):	69
<u>6. DISCUSSÃO</u>	<u>114</u>

6.1. COMPARAÇÃO ENTRE DOSES DE VACINAS: 87 PARTICIPANTES ACOMPANHADOS DESDE O INÍCIO DO PROJETO 118	118
6.2. COMPARAÇÃO ENTRE CEPA ANCESTRAL E VARIANTES UTILIZANDO AMOSTRAS DE VACINADOS COM UMA, DUAS E TRÊS DOSES DE VACINAS	118
6.3. COMPARAÇÃO ENTRE FAIXAS ETÁRIAS REALIZADA COM CEPA ANCESTRAL E VARIANTES DELTA E ÔMICRON COM INDIVÍDUOS COM UMA, DUAS E TRÊS DOSES	121
6.4. COMPARAÇÃO ENTRE VACINAS, TESTADAS COM CEPA ANCESTRAL REALIZADA A PARTIR DE AMOSTRAS DE PARTICIPANTES COM UMA, DUAS E TRÊS DOSES	122
6.5. COMPARAÇÃO ENTRE SEXOS, TESTADAS COM CEPA ANCESTRAL E VARIANTES, COM INTEGRANTES VACINADOS COM UMA, DUAS E TRÊS DOSES	122
6.6. COMPARAÇÃO DE TÍTULOS DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL, REALIZADA A PARTIR DE AMOSTRAS DE VACINADOS COM UMA, DUAS E TRÊS DOSES. COMPARAÇÃO ENTRE CEPA ANCESTRAL E DELTA E TAMBÉM ENTRE CEPA ANCESTRAL E ÔMICRON	123
6.7. CORRELAÇÃO ENTRE TÍTULO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E TEMPO: CEPA ANCESTRAL, VARIANTE ÔMICRON E AMBAS COM AMOSTRAS PAREADAS.....	124
7. CONCLUSÕES	125
7.1. CONCLUSÃO GERAL.....	125
7.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	126
7.2.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO VÍRUS SARS-CoV-2 EM AMOSTRAS CLÍNICAS:	126
7.2.2. AVALIAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES, ATRAVÉS DO TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO (VNT- ECP) EM SOROS DE INDIVÍDUOS VACINADOS COM DIFERENTES VACINAS	126
7.2.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A NEUTRALIZAÇÃO VIRAL LEVANDO EM CONTA A FAIXA ETÁRIA, DOSE DE VACINA, TEMPO APÓS VACINAÇÃO, VARIANTE DO SARS-CoV-2, HISTÓRICO DE COVID-19.....	127
REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICES	135
A. APÊNDICE A: Vídeos A1 e A2	135
B. APÊNDICE B: Vídeos B1 e B2.....	135
C. APÊNDICE C: Vídeos C.....	136
D. APÊNDICE D: Vídeos D.....	136
E. APÊNDICE E: Vídeos E	136

F. APÊNDICE F: VÍDEO F.....	136
G. APÊNDICE G: VÍDEO G.....	136
H. APÊNDICE H: VÍDEO H.....	136
I. APÊNDICE I: VÍDEO I.....	136
J. APÊNDICE J: ORIGEM DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DO BIORREPOSITÓRIO.....	136
K. APÊNDICE K: AMOSTRAGEM DE SOROS.....	136

ANEXOS..... 138

A. ANEXO A: EXEMPLO DE LAUDO (VNT/ELISA/QPCR).....	138
B. ANEXO B: EXEMPLO DE LAUDO (VNT/ELISA).....	139
C. ANEXO C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1.....	140
D. ANEXO D: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 2.....	147
E. ANEXO E: FICHA DE COLETA	154

1. INTRODUÇÃO

A história da humanidade tem tido episódios de doenças infecciosas que aumentaram significativamente as taxas de mortalidade, perturbando social e economicamente grandes comunidades e tendo impactos duradouros. Geralmente, estas doenças são causadas por agentes infecciosos microscópicos.

Dependendo do impacto geográfico, o status epidemiológico pode ser classificado com surto, endemia, epidemia ou pandemia. O surto é caracterizado pelo aumento repentino e inesperado de casos em uma determinada região ou comunidade. A endemia é definida quando uma doença apresenta recorrência em uma determinada região, porém não há aumentos significativos no número de casos. A epidemia é caracterizada pelo aumento do número de casos de uma determinada doença em várias regiões, mas que não representa uma escala global. Já a pandemia é designada quando ocorre disseminação em pelo menos três continentes (CDC, 2022a).

O mundo já presenciou várias pandemias no decorrer da história da humanidade, como por exemplo a Peste bubônica (bactéria *Yersinia pestis*) no século 14. Doença disseminada pela picada de pulgas infectadas. Os sintomas são caracterizados pelos inchaços de gânglios linfáticos do pescoço, virilha e axilas. Também pode incluir febre, calafrios, fadiga e dores musculares e de cabeça. Acredita-se que pode ter matado 100 milhões de pessoas (CDC, 2022b).

A varíola (vírus *Orthopoxvirus variolae*) preocupou a humanidade por mais de 3 mil anos. A transmissão do vírus se dá por meio das vias respiratórias e pode causar febre, erupções na boca, garganta e rosto. Em 1980 foi erradicada do planeta após vacinação em massa (CDC, 2022c).

A cólera (bactéria *Vibrio cholerae*) teve sua primeira pandemia em 1817 matando centenas de milhares de pessoas. A transmissão ocorre pelo consumo de água ou alimento contaminado. Os sintomas incluem, diarreia intensa, enjoo e cólicas (SALIM; LAN; REEVES, 2005).

Em 1918 houve a pandemia de Gripe espanhola (subtipo do vírus Influenza - H1N1). É possível que tenha matado aproximadamente 50 milhões de pessoas. Os sintomas são febre, tosse, coriza e dor no corpo (CDC, 2022d).

A gripe suína foi a primeira pandemia do século 21 (vírus Influenza - H1N1) e matou aproximadamente 16 mil pessoas. A transmissão ocorre por gotículas

respiratórias no ar ou em superfície contaminada. Os sintomas incluem febre, dor no corpo e garganta, calafrio e tosse (CDC, 2022e).

Por último, a Covid-19 (vírus SARS-CoV-2) que foi anunciada como pandemia no dia 11 de março de 2020. Os sintomas são cefaleia, perda do olfato, obstrução nasal, tosse, astenia, mialgia, rinorreia, disfunção gustativa, dor de garganta e febre (HARRISON; LIN; WANG, 2020; LECHIEN et al., 2020). A transmissão se dá por meio de gotículas respiratórias, contato direto com pessoas ou superfícies contaminadas. A contaminação também pode ocorrer por contato fecal-oral (LIU et al., 2020a; MODROW et al., 2013; WHO, 2020a) e por meio de aerossóis quando há exposição a altas concentrações em um ambiente fechado (GE et al., 2020). Até outubro de 2022 havia aproximadamente o registro de 615 milhões de casos da doença e 6,5 milhões de mortes no mundo, sendo que aproximadamente 686 mil dessas mortes aconteceram no Brasil (JHU, 2022a).

Os coronavírus (CoVs) são velhos conhecidos, possuem grande distribuição e alta prevalência, assim como grande diversidade genética e recombinação frequente de seus genomas. Por isso, novos tipos de coronavírus podem surgir periodicamente, principalmente onde há proximidade humano-animal (CUI; LI; SHI, 2019; ZHU et al., 2020). Não foi a primeira vez que um tipo de coronavírus causou danos à humanidade. Entre 2002 e 2003, com taxa de mortalidade de 10%, foi identificado o SARS-CoV que causava Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), síndrome que também pode ser provocada por outros agentes. Anos mais tarde, em 2012, surgiu outro coronavírus causando a *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS-CoV), com taxa de mortalidade ainda mais alta, 37% (RABI et al., 2020; WHO, 2019). Apesar de terem sido duas situações de extrema importância, não tomaram a proporção de pandemia.

Embora o mundo tenha presenciado várias pandemias, existe a necessidade de um tempo para entender a situação e para formulação de protocolos sanitários.

Com a pandemia da Covid-19 não foi diferente, foram necessários muitos grupos de pesquisa no mundo inteiro para construir conhecimento e disseminar informações para que pudessem ser tomadas decisões e formuladas estratégias de contenção do vírus. Tais estratégias são extremamente necessárias principalmente quando ainda não há vacina disponível para aplicação em massa, como aconteceu no Brasil até meados de janeiro de 2021. Mesmo após o início da vacinação em massa, outras dúvidas e anseios surgiram, principalmente acerca do desempenho das vacinas. E com a chegada de novas variantes, mais perguntas a serem respondidas.

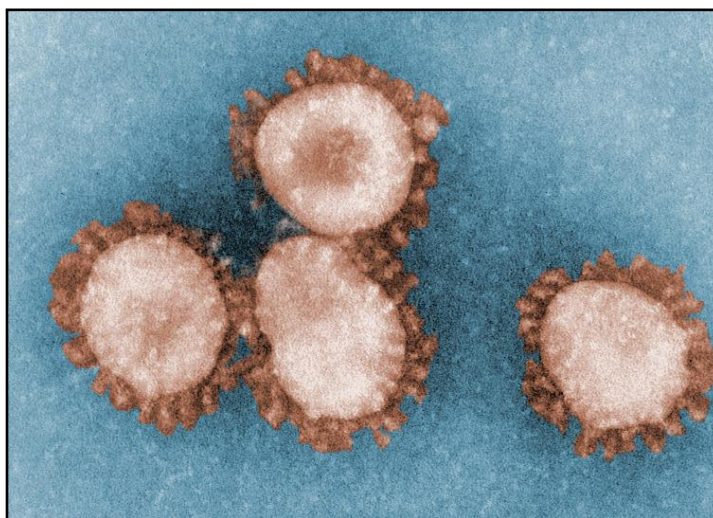
Desta forma, o desenvolvimento desta pesquisa teve o objetivo de contribuir com informações relevantes sobre o período de transmissão de pacientes com Covid-19 e avaliar a produção de anticorpos neutralizantes de indivíduos vacinados com até três doses, fornecendo resultados que servem de base para as constantes atualizações das vacinas disponíveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

Em 1965, durante uma epidemia de resfriado comum, virologistas britânicos isolaram um vírus humano associado a essa patologia (TYRRELL; BYNOE, 1965). Três anos depois foi possível observar por microscopia eletrônica que esses vírus possuíam proteínas de envelope semelhantes à uma coroa, por tanto essa característica morfológica definiu a nomenclatura dessa família de vírus, denominado de coronavírus (**CoV**) (ALMEIDA; BERRY, 1968). Nos anos seguintes, foram identificados os coronavírus humanos 229E (Figura 1) e OC43. E após o surgimento de surtos relacionados com doenças respiratórias em diversas partes do mundo, outros tipos de coronavírus foram descobertos, como NL63 e HKU1.

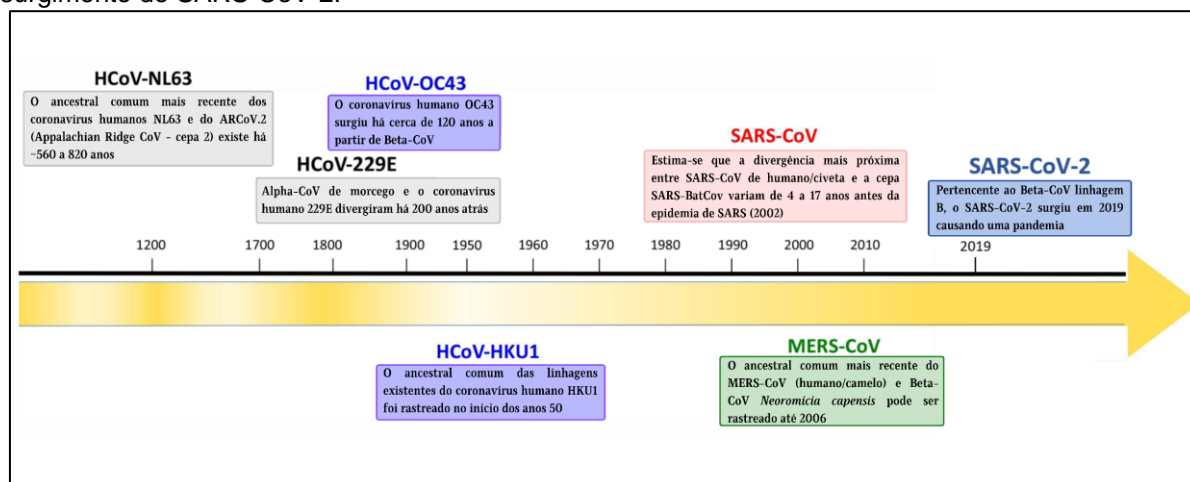
Figura 1 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão, digitalmente colorida (TEM) de 1975. A imagem mostra quatro partículas de coronavírus 229E humano, que são membros da família Coronaviridae.



Fonte: (CDC, 2020)

Uma evidência da grande dispersão dessa família está relacionada com pesquisas sorológicas que detectam a presença de anticorpos em grande porcentagem da população mundial, indicando que os CoVs possuem ampla disseminação. É estimado que 10% das infecções do trato respiratório são causadas por coronavírus (MODROW et al., 2013). Na figura 2 é possível observar a linha do tempo desde o surgimento dos CoVs até o atual SARS-CoV-2.

Figura 2 – Linha do tempo descrevendo o surgimento dos coronavírus até o ano de 2022 com o surgimento do SARS-CoV-2.

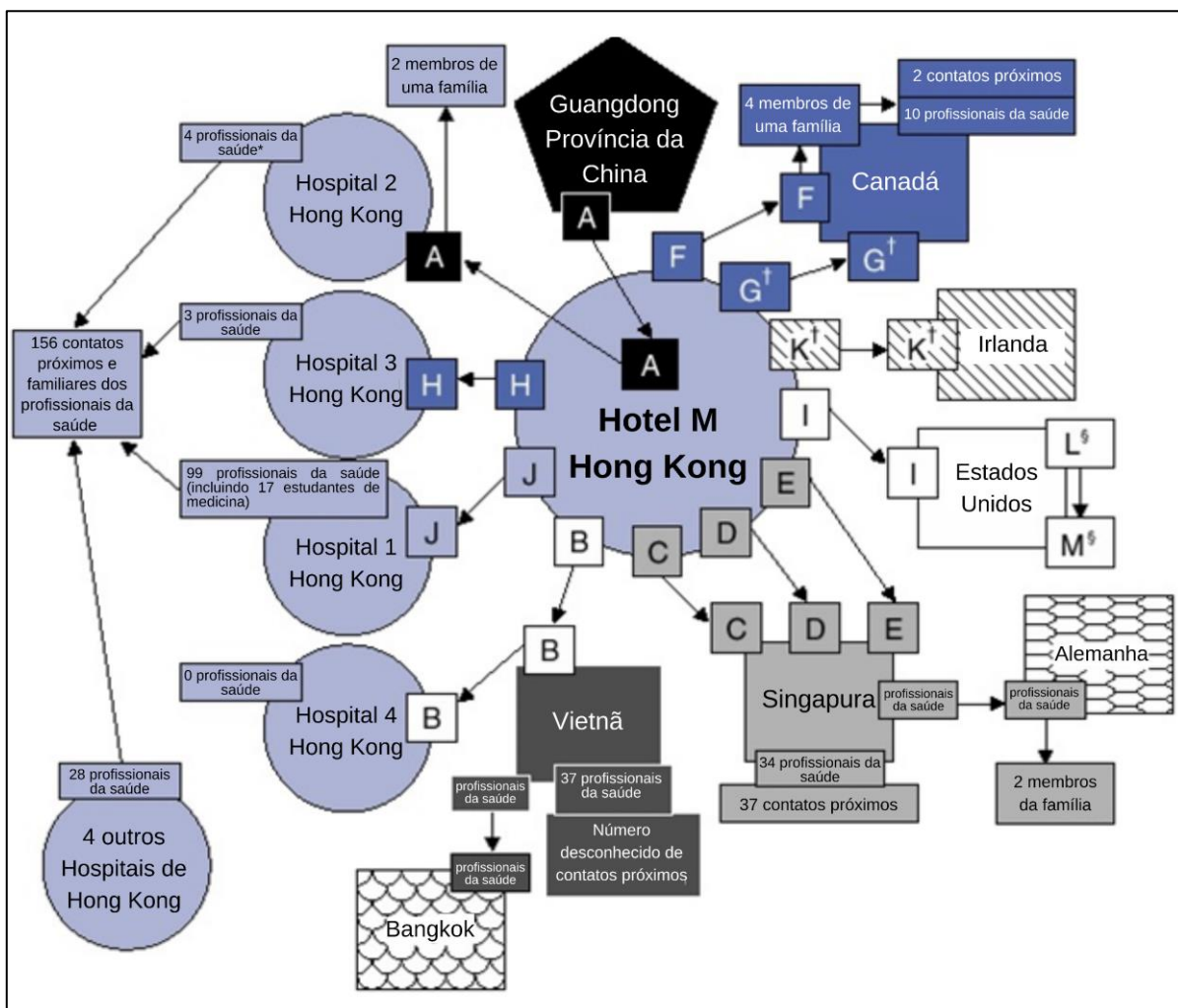


Fonte: Adaptada de (FORNI et al., 2017)

Um novo tipo de CoV altamente patogênico que causou a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), entre 2002 e 2003, foi responsável por mais de 8 mil infecções e mais de 700 mortes no mundo, representando uma taxa de mortalidade de 10%. Tudo começou em 11 de fevereiro de 2003, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi informada sobre mais de 300 pessoas que apresentavam um quadro de “pneumonia infecciosa atípica”, sendo 100 delas profissionais da saúde e contabilizando cinco mortes. No mês seguinte, um médico infectado da província de Guangdong permaneceu em um hotel de Hong Kong. Este médico transmitiu a doença para dez hóspedes que transportaram o vírus para outros países como Cingapura, Vietnã, Irlanda, Estados Unidos e Canadá (Figura 3) (CHERRY, 2004).

Durante a segunda onda de infecção nesses países, muitos profissionais da saúde e suas respectivas famílias foram infectados. Com isso a doença chegou a mais países. Até então não havia um nome oficial para a doença, mas em 10 de março de 2003 ela começou a ser chamada de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV). Neste mesmo mês, um coronavírus foi identificado como agente etiológico da doença e seu genoma foi sequenciado por pesquisadores do *Instituto Bernhard Nocht* em Hamburgo e outros grupos de pesquisa internacionais (WHO, 2021). As medidas de contenção da OMS impediram que o vírus se espalhasse ainda mais. Foram adotadas medidas de quarentena, proibição de entrada, restrições de viagem, verificações em aeroportos e informação à população.

Figura 3 – Cadeia de transmissão do SARS-CoV, em 2003, de hóspedes do *Hotel Metropolitan* em Hong Kong. O paciente A, de Guangdong, ficou hospedado no hotel e transmitiu o vírus para os pacientes B, C, D, E, F, G, H, I, J e K. As setas indicam a rota de transmissão dos indivíduos.



Fonte: Adaptada de (CHERRY, 2004)

Carlo Urbani foi um dos primeiros médicos a reconhecer que a SARS-CoV era uma pneumonia nova e incomum que poderia representar um grande risco à saúde humana. Ele trabalhava na OMS e era especialista em doenças infecciosas. Nos meses de fevereiro e março de 2003, em conjunto com a OMS e governos de países afetados pela SARS-CoV, ele ajudou na implementação de medidas de prevenção e controle da disseminação da doença no Vietnã e Sudeste Asiático. Nesse período, Urbani se infectou e faleceu de SARS-CoV no final do mês de março do mesmo ano (CHERRY, 2004; MODROW et al., 2013).

As informações sobre a doença e o agente etiológico se disseminaram por meio da Internet. Então, quando foi divulgado que o novo vírus havia sido transmitido a humanos por meios zoonóticos, foram feitos testes sorológicos em trabalhadores do mercado de Guangdong e análises em muitas espécies de animais que lá eram

mantidos, entre eles civetas (*Paguma larvata*) e cão-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*).

Nos trabalhadores foram encontrados anticorpos que reagiram com as proteínas do coronavírus da SARS-CoV. Em amostras de fezes e esfregaços de narinas de civetas e cão-guaxinins, foi encontrado um coronavírus com genoma quase idêntico ao do SARS-CoV. Porém, quando foi realizada a mesma investigação em civetas e cão-guaxinins que viviam em habitat natural, o vírus não foi encontrado. Com isso foi concluído que estes não representavam um hospedeiro natural do vírus. Logo foi detectado altas concentrações do vírus causadores da SARS-CoV em morcegos do gênero *Rhinolophus*, evidenciando que provavelmente estes eram os hospedeiros naturais.

Esse tipo de morcego também era comercializado nos mercados. E por estarem em condição de espaço limitado com outros animais, os morcegos possivelmente transmitiram o vírus para os civetas através das fezes, e civetas transmitiram para trabalhadores e frequentadores do mercado (MODROW et al., 2013).

Em 2012, no Oriente Médio, surgiu um novo coronavírus causando a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), com taxa de mortalidade de 37% e que até nos dias atuais ainda circula (RABI et al., 2020; WHO, 2019). De abril de 2012 a novembro de 2022, mundialmente foram confirmados em laboratório 2601 casos da MERS no mundo, com 935 mortes. A maioria desses casos foi relatada na Arábia Saudita, com 2.194 casos e 854 mortes relacionadas. (WHO, 2022a).

Ambos CoVs são de origem zoonótica (DROSTEN et al., 2003; MODROW et al., 2013; PEIRIS et al., 2003; RABI et al., 2020; ZAKI et al., 2012). Desta forma, foi possível perceber que esta família de vírus também pode gerar variantes que causam doenças respiratórias graves em humanos (MODROW et al., 2013; RABI et al., 2020).

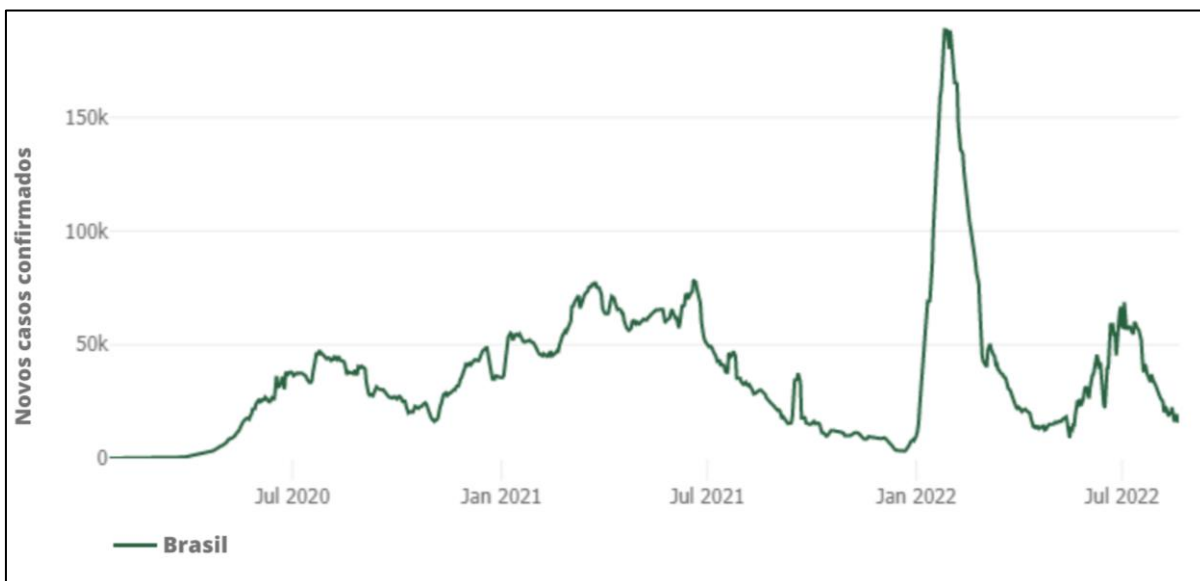
Devido à grande distribuição e alta prevalência dos CoVs, assim como a grande diversidade genética e recombinação frequente de seus genomas, além do aumento da proximidade humano-animal, novos tipos de coronavírus podem surgir periodicamente (CUI; LI; SHI, 2019; ZHU et al., 2020). No final de 2019, em Wuhan, província de Hubei na China, várias unidades de saúde locais relataram a existência de pacientes com quadro de pneumonia de causa desconhecida, mas que estavam ligados epidemiologicamente a um mercado de frutos do mar e animais silvestres vivos (EUROPEAN CDC, 2020a; ZHU et al., 2020). Em janeiro de 2020, o *Centers for*

Disease Control and Prevention (CDC) da China relatou a detecção de um novo CoV (2019-CoV) causador da pneumonia de alguns desses casos mencionados (EUROPEAN CDC, 2020a). Com isso, em 12 de janeiro de 2020, a OMS denominou temporariamente este vírus de “novo coronavírus” (2019-nCoV). Em 12 de fevereiro, a doença foi oficialmente nomeada como Covid-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*). Rapidamente o vírus se espalhou simultaneamente em várias partes do mundo, caracterizando uma doença infecciosa que pode ser transmitida facilmente de pessoa para pessoa. Conseqüentemente, em 11 de março de 2020, a OMS declarou que a Covid-19 representava uma pandemia. Logo em seguida, como base na filogenia e taxonomia, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) designou oficialmente o nome do vírus como SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP, 2020; LIU; KUO; SHIH, 2020).

Desde então a Covid-19 continuou se espalhando pelo mundo. Em abril, a Europa e América do Norte presenciaram seus primeiros grandes surtos, mas à medida que começavam a diminuir, a América Latina e Ásia apresentaram aumento de casos. O Brasil não ficou de fora. Segundo o Ministério da Saúde, em outubro de 2022, o Brasil contava com mais de 34 milhões de pessoas que foram infectadas pelo SARS-CoV-2, das quais cerca de 686 mil faleceram (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). A figura 4 apresenta a evolução do número de novos contágios no Brasil desde julho de 2020 até julho de 2022. Já a figura 5 apresenta a evolução do número de casos no Brasil e outros países, também no período de julho de 2020 até julho de 2022. Desta forma, é possível observar os meses onde ocorreram as ondas de Covid-19 e comparar o número de casos entre os países apresentados no gráfico.

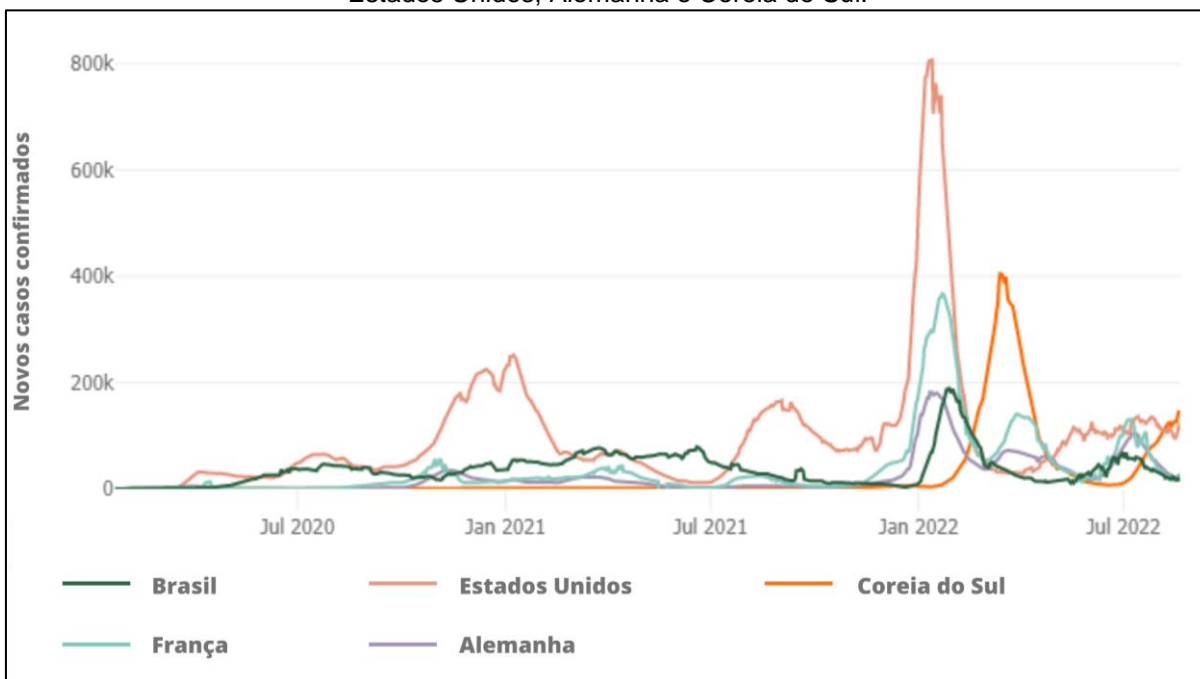
A chegada da Covid-19 no Brasil trouxe muitos desafios para os laboratórios que realizaram diagnósticos para a doença e para laboratórios de virologia. Desde o início de 2020 o LVCM- Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo se dedicou à realização de diagnóstico de Covid-19. O primeiro isolamento do vírus no Brasil foi realizado no LVCM no final de fevereiro de 2020, proveniente de amostra de um paciente do Hospital Albert Einstein que se tornou o paciente número 1 do Brasil.

Figura 4 – Casos cumulativos de SARS-CoV-2 de julho de 2020 até julho de 2022 – Brasil.



Fonte: Adaptada de (JHU, 2022b)

Figura 5 – Casos cumulativos de SARS-CoV-2 de julho de 2020 até julho de 2022 – Brasil, França, Estados Unidos, Alemanha e Coreia do Sul.



Fonte: Adaptada de (JHU, 2022b)

Deste isolado, o LVCM produziu centenas de frascos com vírus inativados e vírus viáveis para serem usados como biorrepositório e distribuídos para todo o território nacional. Com a chegada de variantes, o mesmo trabalho de produção e distribuição foi realizado. Houve uma participação intensa do MCTI - Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação e dos CORREIOS do Brasil nessa operação (ARAÚJO et al., 2020; CALDAS et al., 2020) (Figura 6).

Figura 6 – Produção de variantes de SARS-CoV-2: O Laboratório de Virologia Clínica e Molecular da USP participou da produção e disponibilização de amostras inativadas e viáveis para laboratórios da RedeVírus do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações.



O LABORATÓRIO DE VIROLOGIA CLÍNICA E MOLECULAR (LVCM), da USP, e o LABORATÓRIO DE ESTUDOS DE VÍRUS EMERGENTES (LEVE), da UNICAMP, já estão disponibilizando amostras inativas e viáveis dos variantes P1 e P2 de SARS-CoV2 para distribuição nacional no contexto da REDE-VÍRUS, do MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES (MCTI). Os laboratórios que necessitarem das amostras virais para conduzirem experimentos voltados ao diagnóstico molecular de SARS-CoV2, genotipagem de SARS-CoV2, testes vacinais, sorológicos, ou outros experimentos conduzidos no contexto da REDE-VÍRUS, devem entrar em contato com os respectivos laboratórios para organização do envio das amostras via CORREIOS.

A SOCIEDADE BRASILEIRA DE VIROLOGIA agradece enormemente aos coordenadores dos laboratórios LVCM e LEVE, Drs. EDISON DURIGON e JOSÉ MODENA, pelos esforços em isolar, produzir e disponibilizar as amostras dos variantes de SARS-CoV2 aos demais laboratórios da Rede.

Fonte: (SBV, 2022)

Em abril de 2020 o LVCM padronizou um teste molecular de baixo custo para ser usado em laboratórios de campanha do MCTI e em Universidades para diagnóstico massivo de Covid-19 (DORLASS et al., 2020). Nesse mesmo mês foi padronizada a técnica de Neutralização (*A cytopathic effect based virus neutralization test* - VNT) usada em triagem de plasma de doadores recuperados da Covid-19 para ser usado no tratamento de pacientes graves nos Hospitais Albert Einstein, Sírio Libanês, Hospital das Clínicas, Brasília e Porto Alegre (WENDEL et al., 2020). Desde março de 2020 o LVCM vem colaborando com 7 hospitais públicos pediátricos da cidade de São Paulo para realização do diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 por qPCR e sorológico por ELISA de pacientes pediátricos, além do monitoramento dos profissionais desses hospitais. No mesmo ano, foi descrito pela primeira vez no mundo uma patologia peculiar associada ao Covid-19 denominada de Síndrome Inflamatória Multissistêmica em Crianças (MIS-C) e ainda em 2020 foi feita a primeira descrição no Brasil deste quadro em crianças atendidas nesses hospitais como consequência de síndrome pós Covid-19 (ALMEIDA et al., 2020; BUONAFINE et al., 2020; DE

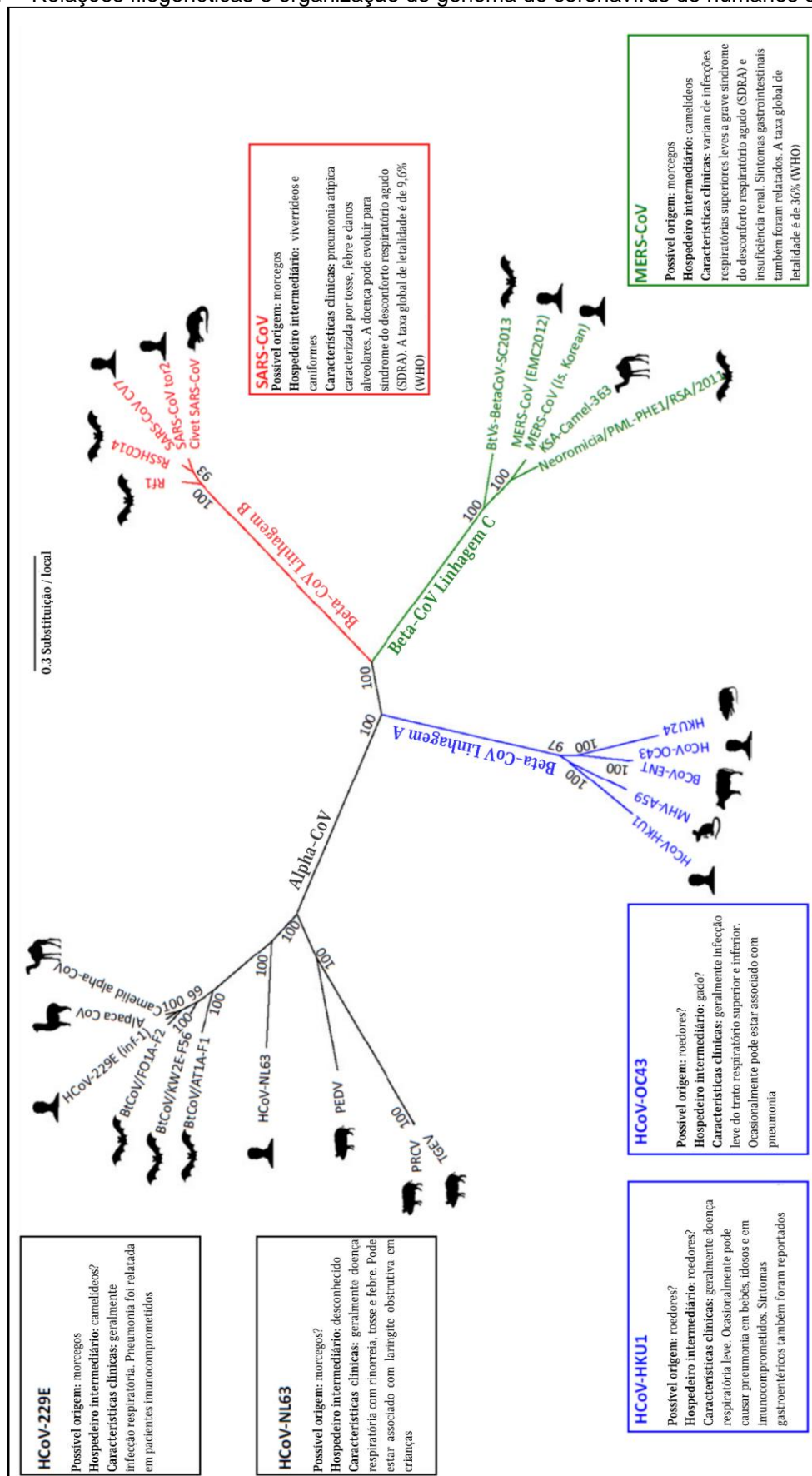
PAULIS et al., 2020). Desde maio de 2020 o LVCM também passou a realizar estudos sobre tratamentos e estratégias no combate de SARS-CoV-2. Como exemplo, tratamento com substância simples de solução salina hipertônica. Este trabalho mostrou que 210 mM NaCl (1.2%) e 260 mM NaCl (1.5%) foram suficientes para inibir a replicação do SARS-CoV-2 em 90% e 100% respectivamente em cultura celular (MACHADO et al., 2020). Em 2021 foi iniciada a vacinação contra Covid-19 no Brasil, com isso o LVCM utilizou a técnica de ELISA para detecção de anticorpos totais e VNT para titulação de anticorpos neutralizantes de pessoas vacinadas. Atualmente o teste é realizado contra a cepa ancestral, variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron.

2.2. Classificação, organização do genoma e replicação dos coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são da família *Coronaviridae* e possuem duas subfamílias: *Torovirinae* e *Coronavirinae*. Na primeira subfamília podem ser encontrados patógenos de peixes que são membros do gênero *Bafinivirus* e patógenos de bovinos, equinos, humanos e suínos do gênero *Torovirus*. Já a subfamília *Coronavirinae* possui quatro gêneros que são classificados conforme a organização e sequência do genoma. Os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* (Figura 7) possuem exemplares capazes de infectar humanos e muitos mamíferos. Os coronavírus da SARS-CoV, MERS e SARS-CoV-2 por exemplo, são membros do gênero *Betacoronavirus*. Já os outros dois gêneros (*Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*) possuem espécies que causam doenças aviárias (Figura 8) (CHEN; LIU; GUO, 2020; MODROW et al., 2013).

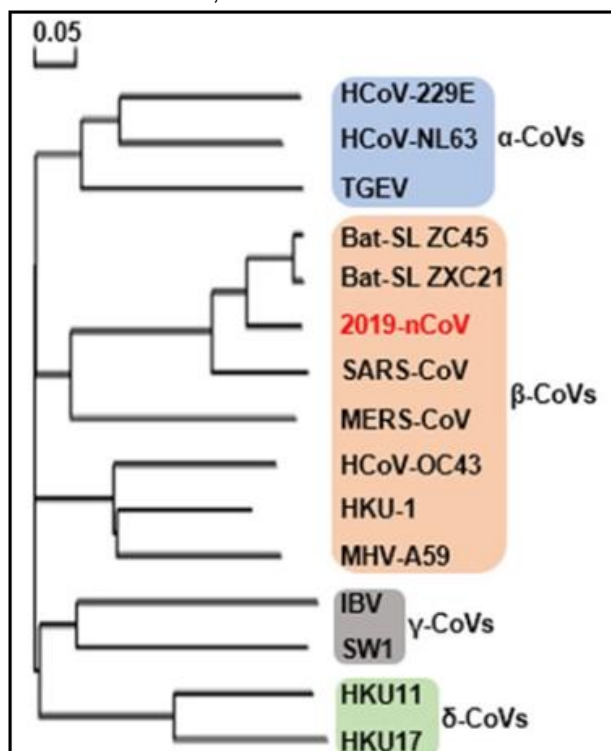
Os CoVs se caracterizam por serem envelopados, a partícula viral possui diâmetro de 80 a 180 nm. O genoma possui aproximadamente 26 a 32 kilobases, sendo o maior genoma conhecido em vírus de RNA. A fita RNA é simples de sentido positivo. Todos os coronavírus compartilham similaridades na organização e expressão de seus genomas. O RNA dos coronavírus está associado à proteína N formando um nucleocapsídeo helicoidal de 10 a 20 nm de diâmetro dentro do vírus. (Figura 9). O nucleocapsídeo deste vírus se associa com a parte interna do envelope por meio de interações entre as proteínas. Os aminoácidos específicos da proteína do nucleocapsídeo, também chamado de proteína N, interagem com o carboxi-terminal da proteína de matriz (proteína M) que está inserida no envelope.

Figura 7 – Relações filogenéticas e organização do genoma de coronavírus de humanos e animais.



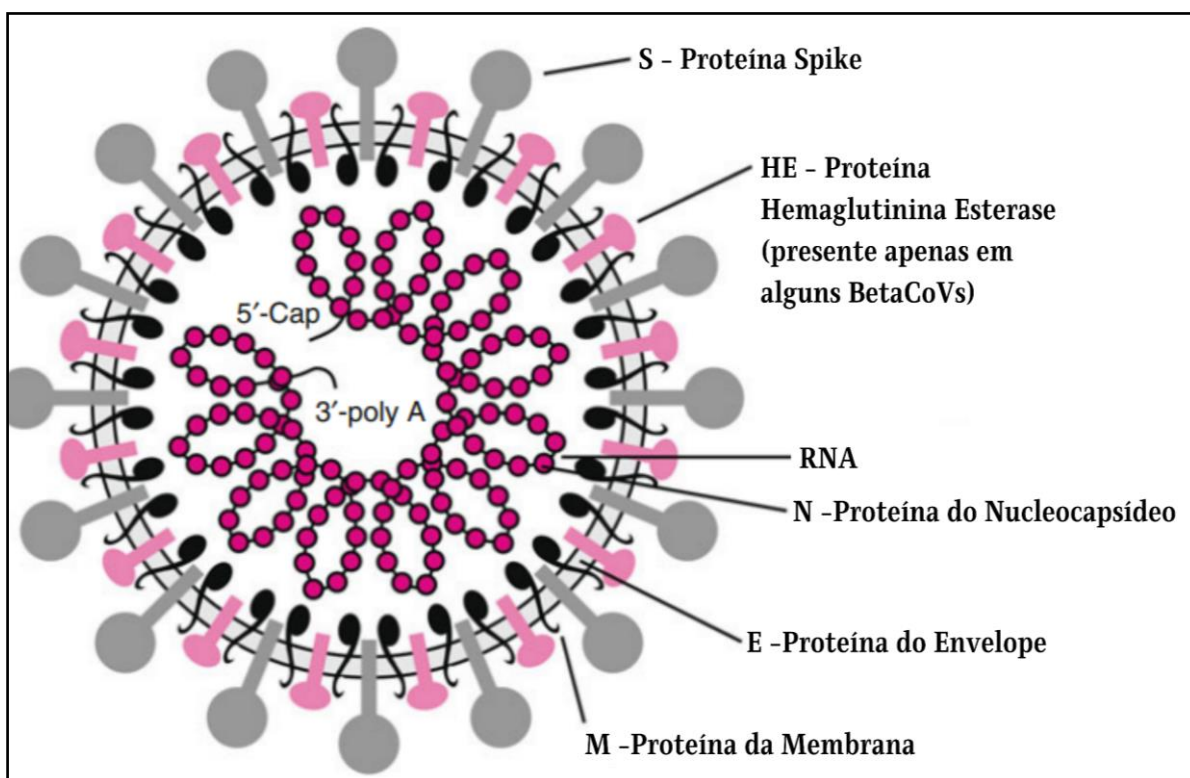
Fonte: (FORNI et al., 2017)

Figura 8 – Árvore filogenética dos coronavírus, com o novo SARS-CoV-2 destacado em vermelho.



Fonte: (CHEN; LIU; GUO, 2020)

Figura 9 – Estrutura da partícula viral do Coronavírus humano: seu genoma de RNA fita simples associado com a proteína N compõem um nucleocapsídeo de formato helicoidal dentro da partícula envelopada. O envelope possui S e HE (glicoproteínas) e proteína M (não glicosilada).

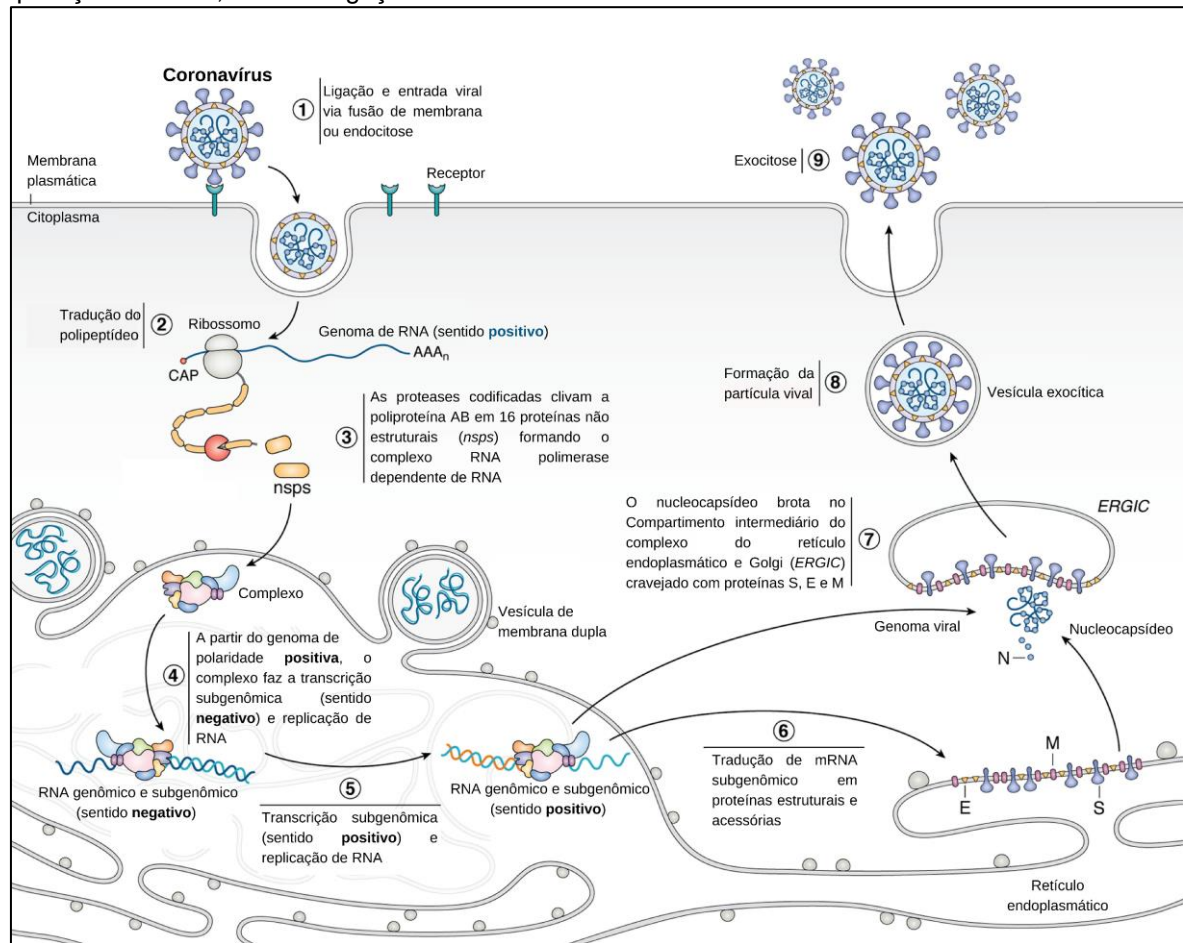


Fonte: (MODROW et al., 2013)

Além disso, há uma proteína glicosilada no terminal amino de 20-30 kDa e duas outras proteínas embutidas no envelope formando trímeros que se projetam cerca de 20 nm da superfície do envelope. Apenas alguns membros do gênero *Betacoronavírus* possuem outra proteína associada à membrana chamada Hemaglutinina esterase (HE). Ela é um dímero de 65 kDa de massa molecular e possui função de hemaglutinação. Os CoVs relacionados à SARS-CoV, MERS e SARS-CoV-2 não apresentam HE (MODROW et al., 2013; SU et al., 2016).

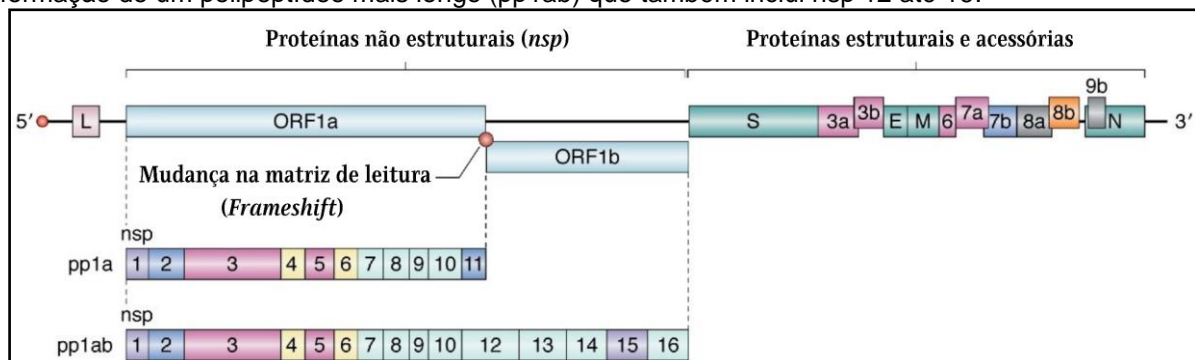
O genoma dos coronavírus é traduzido no citoplasma funcionando como um RNA mensageiro. As poliproteínas não estruturais 1 (pp1) e poliproteínas não estruturais 1ab (pp1ab) são traduzidas principalmente a partir do RNA genômico. Primeiramente as proteases do tipo papaína 1 e 2 (PL1pro e PL2pro) e protease do tipo 3C (3CLpro) são codificadas e clivam a pp1ab em 16 proteínas, incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (nsp12). Depois disso, o RNA genômico é utilizado como molde para que a fita complementar seja sintetizada pelas NSP12, RNA helicase (nsp13), exoribonuclease (nsp14) e endoribonuclease (nsp15). Como o genoma dos coronavírus é de RNA de fita simples de sentido positivo, a fita complementar recém-sintetizada tem polaridade negativa e possui duas funções. A primeira, é servir como molde para a síntese de novos genomas virais. Estes serão usados durante a montagem de novas partículas no final do ciclo. E a segunda função é a síntese dos mRNAs subgenômicos por transcrição descontínua que serão utilizados para a síntese das proteínas de expressão tardia. Essas proteínas de expressão tardia são expressas no Retículo Endoplasmático Rugoso. A montagem ocorre no Golgi, são transportadas por vesículas e liberadas para fora da célula por exocitose (Figura 10) (MODROW et al., 2013; SHEREEN et al., 2020). As proteínas estruturais estão no final da terceira parte do genoma iniciando pela proteína Spike (S), depois proteína de envelope (E), proteína de matriz (M) e proteína do nucleocapsídeo (N). Também há outras pequenas porções (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b e 9b) nesta parte do genoma, mas geralmente não são essenciais para a replicação e diferem significativamente entre os diferentes gêneros (Figura 11).

Figura 10 – Replicação dos coronavírus. Esquema construído com nove etapas que explicam a replicação do vírus, desde a ligação e entrada até exocitose.



Fonte: Adaptada de (HARTENIAN et al., 2020)

Figura 11 – Genoma de SARS-CoV. Há duas categorias de proteínas: proteínas não estruturais (nsp) e proteínas estruturais e acessórias. As proteínas não estruturais são codificadas em ORF1a e ORF1b. A tradução começa em ORF1a e produz pp1a, abrangendo proteínas não estruturais de 1 à 11, ou se o códon de parada não for reconhecido, a tradução continua e também traduz a ORF1b, assim há a formação de um polipeptídeo mais longo (pp1ab) que também inclui nsp 12 até 16.

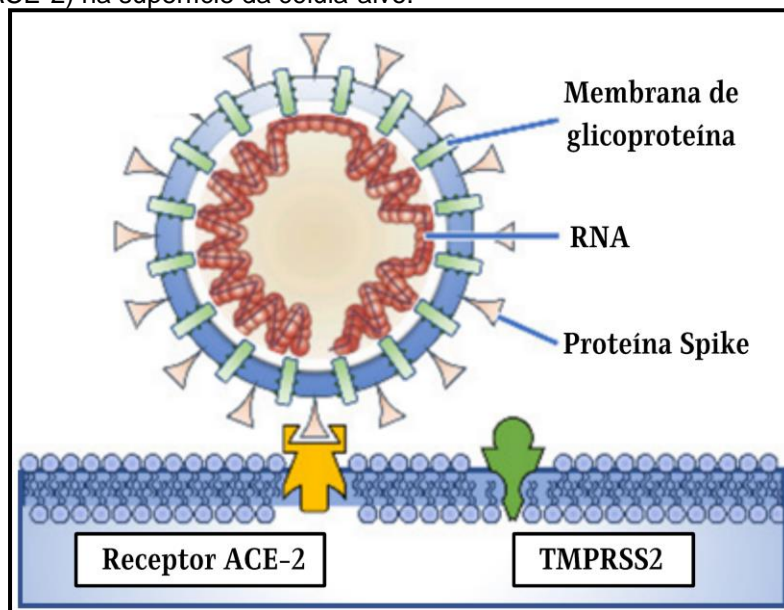


Fonte: Adaptada de (HARTENIAN et al., 2020)

A proteína S possui massa molecular de 180-200 kDa, é glicosilada e ancorada no envelope viral. Ela confere atividade fusogênica ao vírus que se funde à membrana citoplasmática pelo receptor ACE-2 - enzima conversora de angiotensina 2 (Figura 12)

e induz a fusão das membranas de células infectadas e não infectadas para formar policariócitos, porém o mecanismo molecular de fusão da membrana em coronavírus não foi revelado de forma conclusiva. Os anticorpos neutralizantes, por exemplo, são produzidos contra a proteína S durante as infecções. Mas caso não haja esses anticorpos, o vírus se liga às moléculas específicas da superfície celular.

Figura 12 – Durante a infecção, a proteína S se liga aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) na superfície da célula-alvo.



Fonte: Adaptada de (RABI et al., 2020)

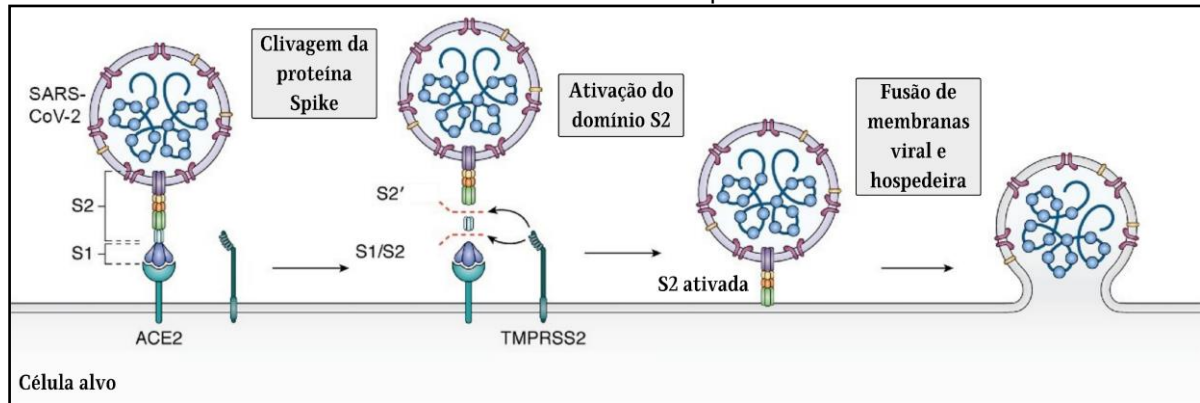
Já a proteína E é essencial para a montagem de partículas e morfogênese, sendo encontrada em diferentes concentrações (MODROW et al., 2013).

A proteína M faz parte da superfície e possui massa molecular de 20 a 30 kDa. Possui três domínios transmembranares, mas apenas algumas regiões amino-terminais são expostas na superfície viral. A interação com a proteína N do nucleocapsídeo é feita pelo terminal carboxi que se encontra na parte interna da partícula viral. E durante todo o ciclo de replicação viral, a proteína de matriz permanece na membrana do retículo endoplasmático (RE).

A ligação vírus-célula ocorre pela ligação da proteína S a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2). Quando a proteína S se liga ao receptor ACE-2, o complexo é processado proteoliticamente pela protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) resultando na clivagem da ACE-2 e ativação da proteína S (Figura 13), facilitando a entrada do vírus na célula-alvo (HARTENIAN et al., 2020). Além da TMPRSS2, a proteína furina também atua sinergicamente na entrada viral por

ativação proteolítica impulsionada por fusão do envelope viral com a membrana celular (ESSALMANI et al., 2022; WALLS et al., 2020).

Figura 13 – Mecanismo de entrada do vírus SARS-CoV-2. A proteína S se liga ao receptor ACE2 da célula hospedeira e é clivada nos locais S1/S2 e S2 pela protease TMPRSS2. Isso leva à ativação do domínio S2 e conduz a fusão das membranas viral e do hospedeiro.

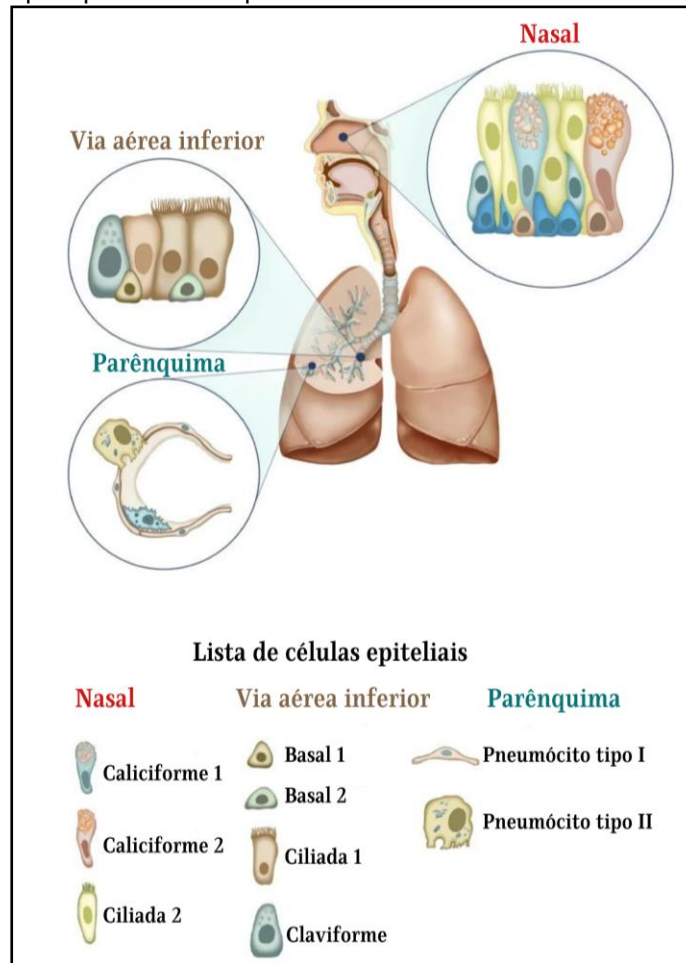


Fonte: Adaptada de (HARTENIAN et al., 2020)

A proteína ACE-2 está presente na superfície de muitas células, como por exemplo nos pneumócitos, enterócitos (Figura 14) e em células de outros tecidos e órgãos. Imagens de microscopia eletrônica mostram que os coronavírus também podem infectar células epiteliais intestinais. Quando eles infectam os macrófagos e linfócitos, são levados pela corrente sanguínea e acessam células de outros órgãos. Tal evento pode ocorrer durante o período de infecção pelo SARS-CoV-2 (Figura 15) (LAMERS et al., 2020).

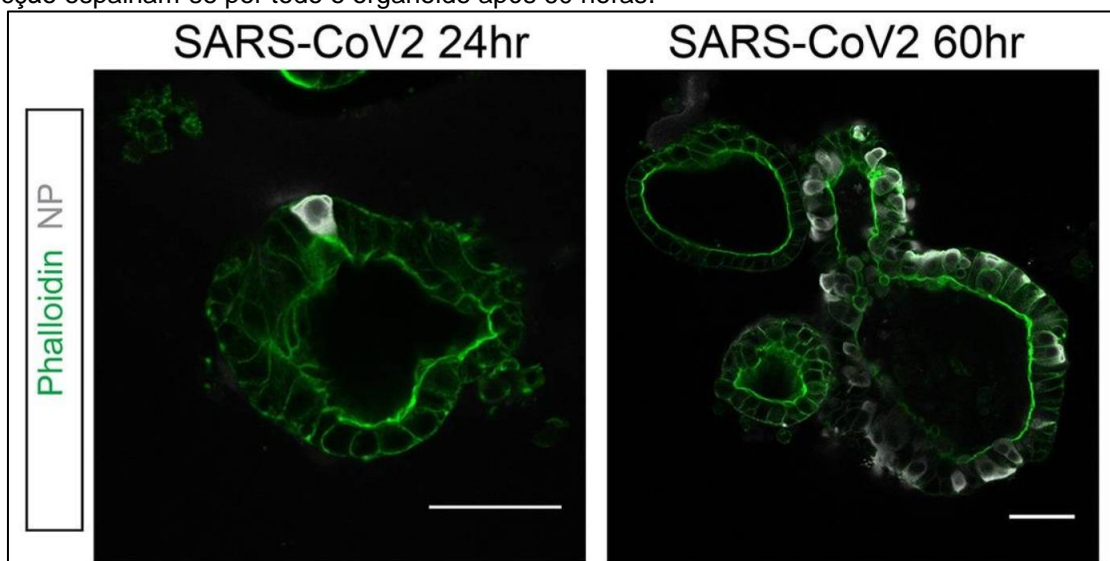
Acredita-se que quando os receptores ACE-2 e TMPRSS2 estão simultaneamente presentes, a célula é mais suscetível à entrada por SARS-CoV-2. A expressão de RNA do receptor de entrada ACE2 e da protease transmembrana II (TMPRSS2) foram encontradas em vários tecidos como cólon, íleo, vesícula biliar, timo fetal e outros (MODROW et al., 2013; RABI et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020).

Figura 14 – A ilustração esquemática mostra as células das regiões nasal, vias aéreas inferiores e parênquima pulmonar que apresentam expressão de ACE2.



Fonte: Adaptada de (SUNGNAK et al., 2020)

Figura 15 – SARS-CoV-2 infecta células em proliferação e enterócitos: Coloração imunofluorescente de hSIOs infectados com SARS-CoV-2. NP cora o capsídeo viral. Após 24 horas, células infectadas são geralmente observadas em organóides. Esses pequenos aglomerados de infecção espalham-se por todo o organoide após 60 horas.

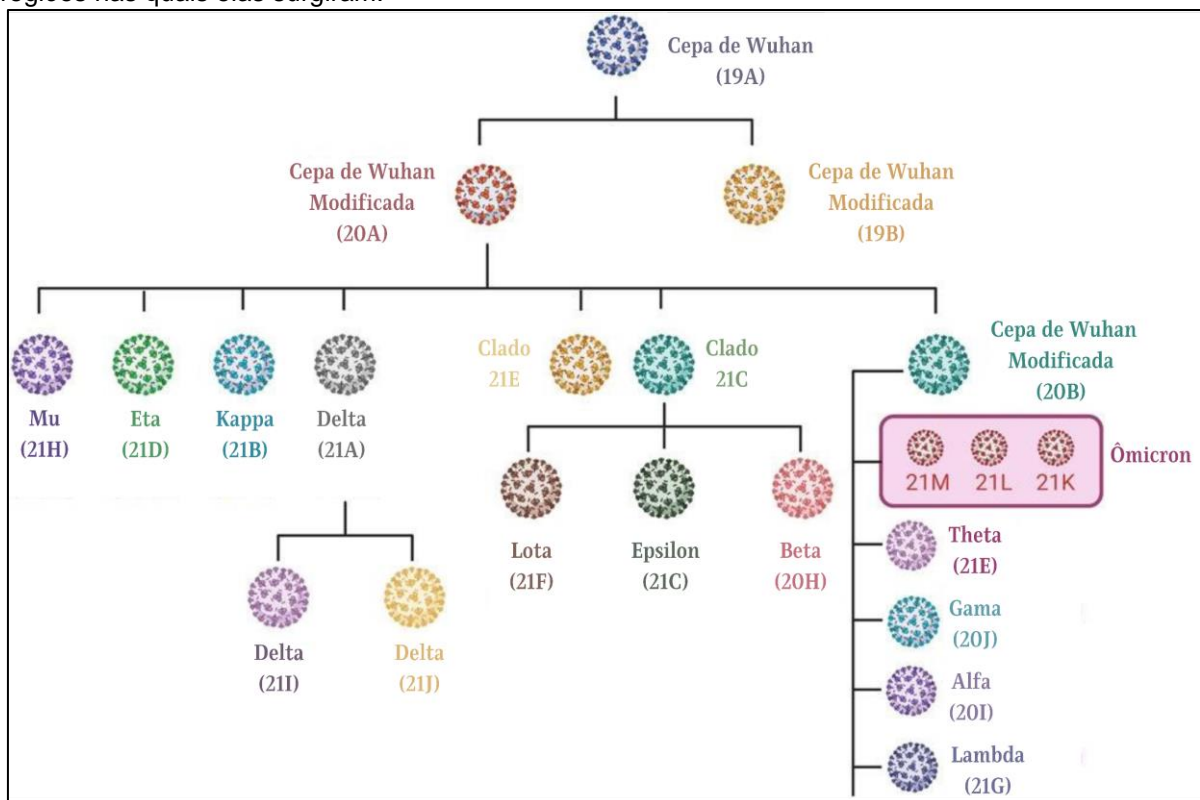


Fonte: Adaptada de (LAMERS et al., 2020)

2.3. Diferentes Variantes de SARS-CoV-2

Desde o surgimento do SARS-CoV-2 novas variantes têm aparecido em diversas partes do mundo (Figura 16). Embora este comportamento seja esperado e geralmente não causa grandes impactos, algumas destas variantes têm gerado preocupação mundial devido às vantagens evolutivas que o vírus possa ter adquirido. Como por exemplo, facilidade na propagação, gravidade da doença e a capacidade de escapar da proteção das vacinas disponíveis.

Figura 16 – Variantes do SARS-CoV-2. Desde o surgimento do SARS-CoV-2 há o monitoramento do surgimento de novas variantes. Na figura é possível observar as variantes do SARS-CoV-2 e seus clados. As nomenclaturas são baseadas em letras do alfabeto grego para evitar estigmas sobre as regiões nas quais elas surgiram.



Fonte: Adaptada de (CHAVDA; PATEL; VAGHASIYA, 2022)

Desde janeiro de 2020 a OMS monitora o surgimento destas novas variantes em colaboração com muitos parceiros, assim é possível avaliar a evolução do SARS-Cov-2. E para evitar estigmas sobre as regiões nas quais elas surgiram, foi proposta nomenclatura baseada em letras do alfabeto grego. A tabela 1 apresenta um resumo das variantes que mais preocupam a OMS devido ao efeito significativo que a propagação destas variantes tem trazido à saúde pública. Além do cuidado na nomenclatura das variantes, também foram criadas classificações que caracterizam como Variantes de Interesse (do inglês VOIs), quando o genoma possui mutações

que mudem o fenótipo do vírus e que foram identificadas como causadora de transmissão comunitária, de múltiplos casos de Covid-19 ou tiver sido detectada em vários países. Variantes de Preocupação (do inglês VOCs), são consideradas VOCs quando por meio de uma avaliação comparativa, demonstrou estar associada a uma ou mais alterações em um grau de significância para a saúde pública global. Essas alterações podem ser aumento da transmissibilidade ou alteração prejudicial na epidemiologia da Covid-19; aumento da virulência ou mudança na apresentação clínica da doença; diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis. (WHO, 2022b).

Tabela 1 – Variantes que mais preocuparam a OMS devido ao efeito significativo de propagação. São consideradas VOCs quando por meio de uma avaliação comparativa, demonstrou estar associada a uma ou mais alterações em um grau de significância para a saúde pública global. Na tabela é possível consultar o nome (letra grega), linhagem, país onde foi documentada e data da documentação.

Denominação da OMS	Linhagem	País onde foi documentada	Data da documentação
Alpha	B.1.1.7	Reino Unido	Setembro de 2020
Beta	B.1.351	África do Sul	Maio de 2020
Gama	P.1	Brasil	Novembro de 2020
Delta	B.1.617.2	Índia	Outubro de 2020
Ômicron*	B.1.1.529	Vários países	Novembro de 2021

* Inclui BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 e linhagens descendentes. Também inclui formas recombinantes circulantes BA.1/BA.2, como XE. Atualmente é a VOC que está em maior circulação.

Fonte: (WHO, 2022b)

Essas não são as únicas variantes reportadas no mundo. A tabela 2 apresenta outras que estão sendo monitoradas, mas que até agora não têm tido efeitos tão significativos na saúde pública quando comparadas com as variantes da tabela 1.

Tabela 2 – Variantes de interesse: genoma com mutações que mudem o fenótipo do vírus e que foram identificadas como responsáveis pela transmissão comunitária, de múltiplos casos de Covid-19 ou que foram detectadas em vários países. Na tabela é possível consultar o nome (letra grega), linhagem, país onde foi documentada e data da documentação.

Denominação da OMS	Linhagem	País onde foi documentada	Data da documentação
Épsilon	B.1.427/B.1.429	EEUU	Março de 2020
Zeta	P.2	Brasil	Abril de 2020
Eta	B.1.525	Vários países	Dezembro de 2020
Theta	P.3	Filipinas	Janeiro de 2021
Iota	B.1.526	EEUU	Novembro de 2020
Kappa	B.1.617.1	Índia	Outubro de 2020
Lambda	C.37	Peru	Junho 2021
Mu	B.1.621	Colômbia	Agosto 2021

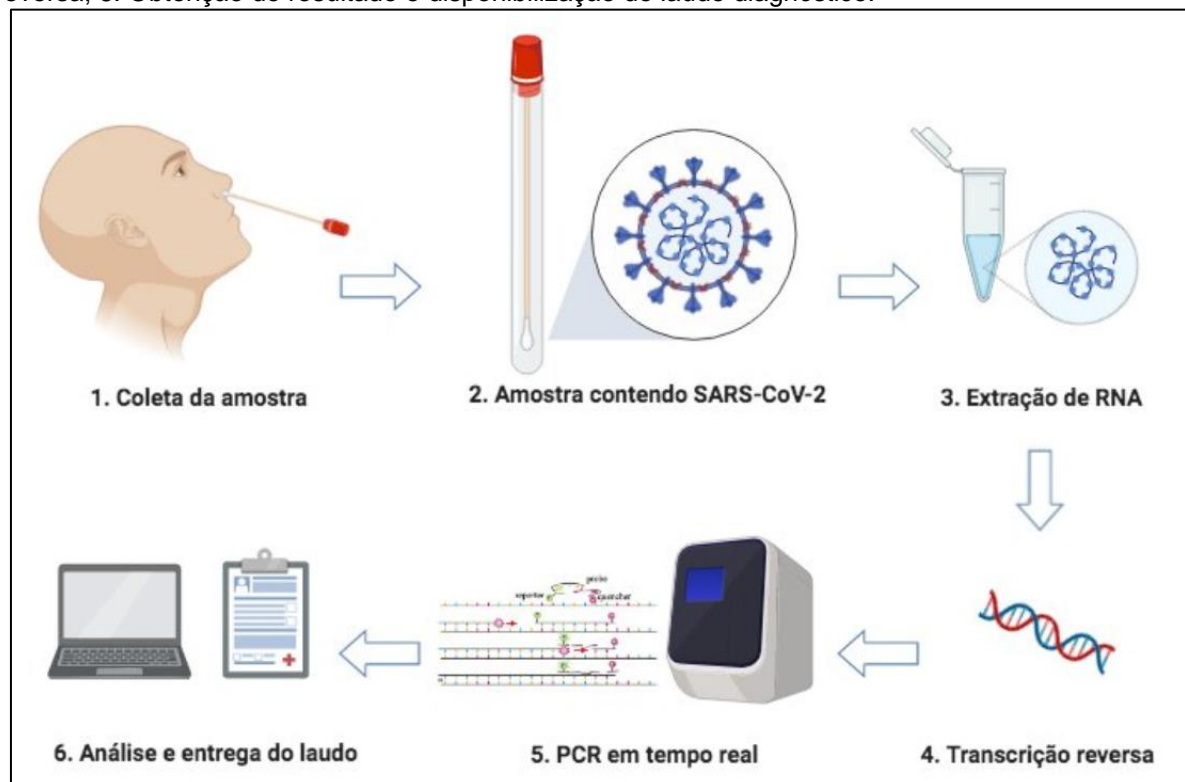
Fonte: (WHO, 2022c)

2.4. Principais métodos Diagnósticos

Há dois métodos de diagnóstico para Covid-19 corriqueiramente utilizados. Um deles é a detecção direta do vírus por teste rápido antigênicos e/ou teste molecular para detecção do RNA viral. E o outro é a detecção de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 (testes sorológicos).

Desde o início desta pandemia o diagnóstico padrão para Covid-19 tem sido o teste molecular que detecta ácido nucleico de SARS-CoV-2 por meio de RT-PCR (Figura 17) a partir de amostras do sistema respiratório (como swabs nasais, orais, saliva) ou fezes (HARRISON; LIN; WANG, 2020).

Figura 17 – Etapas do diagnóstico molecular de Covid-19 (qPCR). 1. Coleta de *swab* de naso e orofaringe; 2. Manutenção de amostra clínica em meio de transporte ou meio de extração; 3. Etapa de extração do ácido nucleico viral; 4 e 5. Diagnóstico molecular por PCR em tempo real com transcrição reversa; 6. Obtenção do resultado e disponibilização do laudo diagnóstico.



Fonte: (UNESP, 2020)

O método consiste em primeiro transformar a fita de RNA em DNA (transcriptase reversa - RT). Uma sequência específica de uma das proteínas virais normalmente o Envelope (E), é procurada na amostra por dois *primers* e uma sonda específica, e se a região homóloga aos primers e sonda for encontrada, o fragmento é multiplicado de forma exponencial até ser detectado pelo equipamento que capta

um sinal luminoso que é “lido” pelo equipamento que gera o resultado em ciclo *threshold*, método qualitativo. O teste molecular geralmente é recomendado para diagnosticar a infecção aguda de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Um teste negativo indica que naquele momento não há infecção ou que a carga viral é indetectável (CDC, 2019a; FIOCRUZ, 2020). RT-qPCR em tempo real é o padrão-ouro para o diagnóstico de Covid-19, porém é um teste de alto custo, inacessível para grande parte dos laboratórios. Embora possa ser menos sensível que RT-qPCR, existe a possibilidade de realizar a PCR em gel de agarose, uma alternativa mais econômica que permite o diagnóstico sem a necessidade de uma máquina de qPCR (CDC, 2019a; DORLASS et al., 2020; FIOCRUZ, 2020), mas a técnica não é aconselhável para uso de diagnóstico de grandes quantidades de teste, por ser mais facilmente passivo a contaminação (DORLASS et al., 2020). Há outra opção de menor custo, a Plataforma Científica Pasteur-USP (SPPU-USP) em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Curitiba desenvolveu um teste utilizando a técnica *RT-LAMP* (transcriptase reversa – amplificação isotérmica mediada por *loop*), o método é mais acessível e apresenta sensibilidade de 90% (capacidade de detectar casos positivos) e especificidade de 100% (capacidade de excluir casos negativos). É um teste simples de reação colorimétrica, que pode ser feito por meio da coleta de saliva ou secreções da nasofaringe (AOKI et al., 2021).

Quando há a infecção, existe a produção de anticorpos desencadeada por antígenos que são substâncias estranhas ao corpo. Assim como a qPCR, o teste rápido de antígenos representa uma forma direta de detecção do patógeno e acusa a infecção ativa, entretanto com menor sensibilidade, uma vez que não há a amplificação exponencial encontrada na qPCR em tempo real. A coleta de *swab* deve ser feita entre o quinto e o sétimo dia de sintomas. Por ser mais simples, rápido e não necessitar de muita estrutura laboratorial, pode ser utilizado em larga escala. É indicado para pacientes com sintomas em lugares onde há muitos casos ou indivíduos assintomáticos que tiveram contato com alguém positivo, ou frequentemente expostos (como profissionais da saúde por exemplo). Porém esse teste não substitui totalmente o RT-qPCR. Se o resultado for positivo, não há a necessidade de confirmar por RT-qPCR. Mas se der negativo e houver presença de sintomas persistentes, é aconselhável fazer a confirmação com o teste molecular (DASA, 2020).

O autoteste é uma modalidade de teste rápido de antígeno. Muito popular nos Estados Unidos e Europa, por algum tempo foi proibido no Brasil, sendo liberado pela

Anvisa em 28 de janeiro de 2022 que regulamentou a utilização de autotestes para Covid-19 no país. O teste não define um diagnóstico, que deve ser realizado por um profissional da saúde. Seu caráter é apenas orientativo. Ou seja, não se trata de um atestado médico. O problema relacionado com esse tipo de teste é a falta de habilidade do usuário em manusear o material e a não notificação nos meios oficiais de monitoramento da doença caso seja positivo (ANVISA, 2022a).

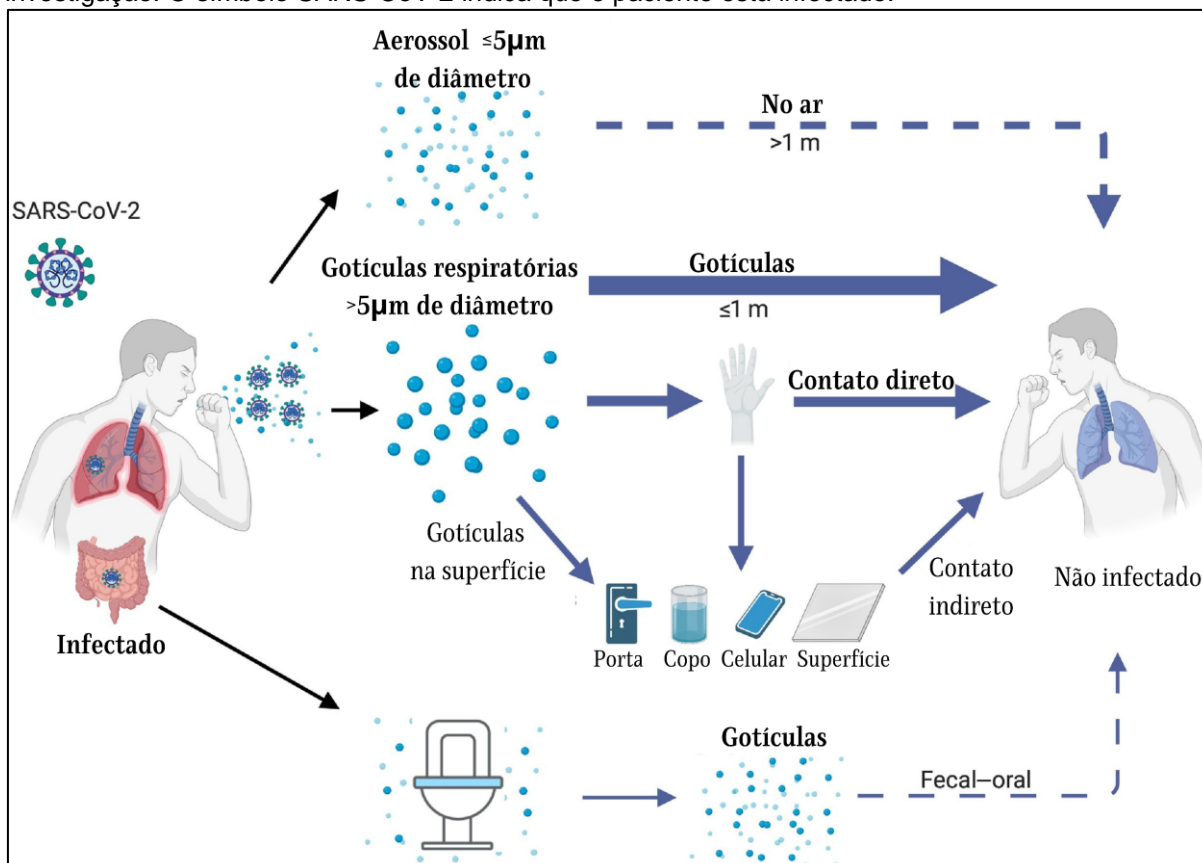
Já o teste sorológico, pesquisa a presença de Imunoglobulinas G, M e A específicas para SARS-CoV-2. Essas imunoglobulinas são também conhecidas como anticorpos IgG, IgM e IgA. Os anticorpos IgM e IgA são produzidos na fase aguda da doença, então aparecem precocemente. Já o IgG é produzido na fase tardia, ou seja, é um anticorpo de memória e pode começar a ser detectado em média a partir do 15º dia após o contágio. Dependendo do teste, duas ou três destas imunoglobulinas podem ser pesquisadas. Há disponível no mercado o imunoensaio enzimático (ELISA), quimioluminescente (CLIA), pesquisa de anticorpos totais (neste caso, pesquisa-se IgG, IgM e IgA) e também um exame chamado algoritmo sorológico. Nesse último, primeiro é feito o exame de anticorpos totais e caso algum seja reagente, é realizado um segundo exame de IgM e IgG. Assim é possível verificar se há anticorpo de fase aguda ou tardia (ANVISA, 2022b; DASA, 2020; FIOCRUZ, 2020).

2.5. Sintomas e transmissão

Publicações com dados de estudos epidemiológicos fornecem evidências de que a Covid-19 é transmitida principalmente pelas pessoas sintomáticas por meio de gotículas respiratórias, contato direto com pessoas ou objetos/superfícies contaminadas. A contaminação também pode ocorrer por contato fecal-oral (LIU et al., 2020a; MODROW et al., 2013; WHO, 2020a). Já outros estudos indicaram que a transmissão também pode ocorrer por meio de aerossóis quando há exposição a altas concentrações de aerossóis em um ambiente fechado (Figura 18) (GE et al., 2020; LEDNICKY et al., 2020).

Em 17 de março de 2020, por exemplo, no condado de *Skagit* em *Washington* USA, um membro de um coral de 122 integrantes informou à Saúde Pública que vários participantes haviam ficado doentes. Três pessoas tiveram resultados de teste positivos para SARS-CoV-2, outras 25 pessoas tinham sintomas compatíveis.

Figura 18 – Rotas de transmissão da Covid-19. Transmissão por gotículas (maior que 5 µm). Aerossol (menor ou igual a 5 µm). O contato direto de um indivíduo infectado para outro. Contágio por objetos contaminados, que ocorre com menos frequência, comparada com transmissão por gotículas. Transmissão fecal-oral. As setas sólidas indicam a transferência viral confirmada de uma pessoa infectada para outra. As linhas tracejadas mostram tipos de transmissão que ainda estão em investigação. O símbolo SARS-CoV-2 indica que o paciente está infectado.



Fonte: adaptado de (HARRISON; LIN; WANG, 2020)

O Sistema de Saúde obteve a lista de membros do coral e iniciou uma investigação. Entre 61 pessoas que compareceram ao evento em 10 de março onde havia uma pessoa sintomática, 53 casos foram identificados (33 confirmados e 20 prováveis). Três das 53 pessoas que adoeceram foram hospitalizadas (5,7%) e duas faleceram (3,7%) (Figura 19) (HAMNER, 2020).

Os sintomas da Covid-19 são variados e podem ser impactados pelas diferentes variantes. Um estudo com 1.420 pacientes infectados com a doença leve ou moderada, indicou que, quando sintomático os sintomas mais comuns são: cefaleia, perda do olfato, obstrução nasal, tosse, astenia, mialgia, rinorreia, disfunção gustativa, dor de garganta e febre (LECHIEN et al., 2020). Corroborando e adicionando dados, o Consórcio Internacional de Infecções Respiratórias Agudas e Emergentes Graves (ISARIC) relatou que os cinco sintomas mais comuns em 88.463 casos hospitalizados de Covid-19 foram: febre, falta de ar, tosse, fadiga e mal-estar

(PRITCHARD et al., 2020). Geralmente esses pacientes são mais jovens e podem ser mais socialmente ativos. E por esse fato, são um potencial fonte de transmissão da doença complicando os esforços para manter a pandemia sob controle (KRONBICHLER et al., 2020).

Figura 19 – Depois de um ensaio de coral, com um membro sintomático, 87% dos participantes desenvolveram Covid-19



Fonte: Adaptada de (HAMNER, 2020)

Segundo o CDC, existem alguns fatores de risco associados a maior probabilidade de desenvolver sintomas graves durante a Covid-19: câncer, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), estado imunocomprometido (sistema imunológico enfraquecido) devido ao transplante de órgão, obesidade (índice de massa corporal [IMC] de 30 ou superior), problemas cardíacos graves (como insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana ou cardiomiopatias), anemia falciforme, diabetes tipo 2 (CDC, 2019b; EUROPEAN CDC, 2020a). Além disso, a idade também é um fator relevante para o desenvolvimento de um quadro grave da doença. A tabela 3 apresenta a relação entre idade e a possibilidade de hospitalização e morte por Covid-19, utilizando a idade de 18-29 anos como comparação. É possível observar que o maior risco de internação e morte estão nos grupos de pessoas adultas e que estes riscos são maiores conforme a idade aumenta (CDC, 2021).

Por esse motivo, em 12 de janeiro de 2020 a OMS publicou a primeira orientação técnica sobre o manejo clínico do novo coronavírus. O paciente só era

liberado do isolamento quando estava recuperado clinicamente e deveria ter além disso, dois resultados seguidos de RT-qPCR negativos no período de 24 horas de intervalo entre eles. Tal recomendação foi baseada nos conhecimentos e experiência com outros coronavírus, como os que causam SARS-CoV e MERS.

Tabela 3 – Relação entre idade e a possibilidade de hospitalização e morte por Covid-19. A faixa etária base para comparação são de pessoas entre 18 e 29 anos.

Faixa etária em comparação com idade de 18-29 anos	Casos	Hospitalização	Morte
0-4 anos	1x	1x	<1x
5-17 anos	1x	<1x	<1x
18-29 anos	Grupo de Referência	Grupo de Referência	Grupo de Referência
30-39 anos	1x	2x	4x
40-49 anos	1x	2x	10x
50-64 anos	1x	3x	25x
65-74 anos	1x	5x	60x
75-84 anos	1x	8x	140x
Maior ou igual a 85 anos	1x	15x	340x

Fonte: Adaptada de (CDC, 2021)

Já em 27 de maio do mesmo ano, a OMS atualizou as orientações sobre os critérios para alta de pacientes do isolamento, pois acreditava-se que apesar do resultado positivo no teste, provavelmente esses pacientes não eram infecciosos, ou seja, não seriam capazes de transmitir o vírus para outra pessoa. Por tanto, o isolamento poderia ser interrompido obedecendo o seguinte critério: pacientes sintomáticos podem ser liberados após 10 dias do início dos sintomas, mais 3 dias adicionais sem sintomas. Já os assintomáticos estariam livres do isolamento 10 dias após o teste positivo para SARS-CoV-2. Segundo a OMS, a atualização destas recomendações foi baseada em estudos recentes da época e poderiam ser modificadas de acordo com novas evidências (WHO, 2020b).

Como o surgimento do vírus SARS-CoV-2 é relativamente recente, até agora não existe uma unanimidade no tratamento de pacientes com Covid-19. Contudo, algumas pesquisas apresentam alternativas tanto no combate dos sintomas como estratégias que possam ajudar na inibição do vírus no corpo do paciente. Para combater a coagulopatia associada a Covid-19, por exemplo, existe a aplicação de anticoagulantes que tem gerado resultados positivos (GODINO et al., 2021; TANG et al., 2020). Outras estratégias que tem mostrado bons efeitos são o uso de coquetel de antivirais (COPIN et al., 2021; WEINREICH et al., 2021), tratamentos com

anticorpos monoclonais (ACTIV-3/TICO LY-COV555 STUDY GROUP, 2021; MAROVICH; MASCOLA; COHEN, 2020) e terapia com plasma convalescente de pacientes recuperados (LIU et al., 2020b; SEKINE et al., 2022).

Atualmente existem várias vacinas contra o vírus SARS-CoV-2 no mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, há 4 vacinas aprovadas pela ANVISA: AstraZeneca (Oxford), CoronaVac para uso emergencial (Sinovac), Janssen&Johnsson (Janssen) e Pfizer (BioNTech) (ANVISA, 2022b). Já foram aplicadas mais de 472.972.308 doses e estima-se que 88.1% da população do Brasil tem ao menos 1 dose, 81.0% tem ciclo completo de vacinação (2ª dose) e 55.9% da população receberam dose de reforço (3ª dose) (OUR WORLD IN DATA, 2022).

Embora a OMS não exija que os pacientes apresentem teste negativo para liberá-los do isolamento, trata-se de uma doença nova e ainda existem muitas incertezas sobre o assunto. Por tanto, se faz necessário realizar pesquisas voltadas para avaliação da viabilidade viral de amostras provenientes de pacientes com diferentes períodos de infecção. E com o início e andamento da vacinação, existe a necessidade de avaliar a resposta imune humoral de indivíduos vacinados e monitorar o desempenho das vacinas frente às novas variantes do SARS-CoV-2.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Determinar títulos de anticorpos neutralizantes, através do teste de neutralização viral por efeito citopático (VNT-ECP) em soros de indivíduos vacinados com diferentes doses de vacinas e avaliar a viabilidade do vírus SARS-CoV-2 em amostras clínicas de pacientes com Covid-19 em diferentes períodos da infecção.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de vírus infeccioso em amostras clínicas de pacientes com Covid-19 em diferentes períodos da infecção, bem como de re-coletas sucessivas tendo como parâmetro a positividade por *Real Time PCR* (qPCR);
- Avaliar a eficiência de isolamento das amostras congeladas em comparação com as que foram mantidas em geladeira;
- Determinar títulos de anticorpos neutralizantes em soros de indivíduos vacinados com uma, duas e três doses de diferentes vacinas utilizadas no Brasil, utilizando cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron;
- Analisar resultados obtidos com a neutralização viral levando em conta a faixa etária, dose de vacina, tempo após vacinação, variante do SARS-CoV-2, histórico de Covid-19.

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

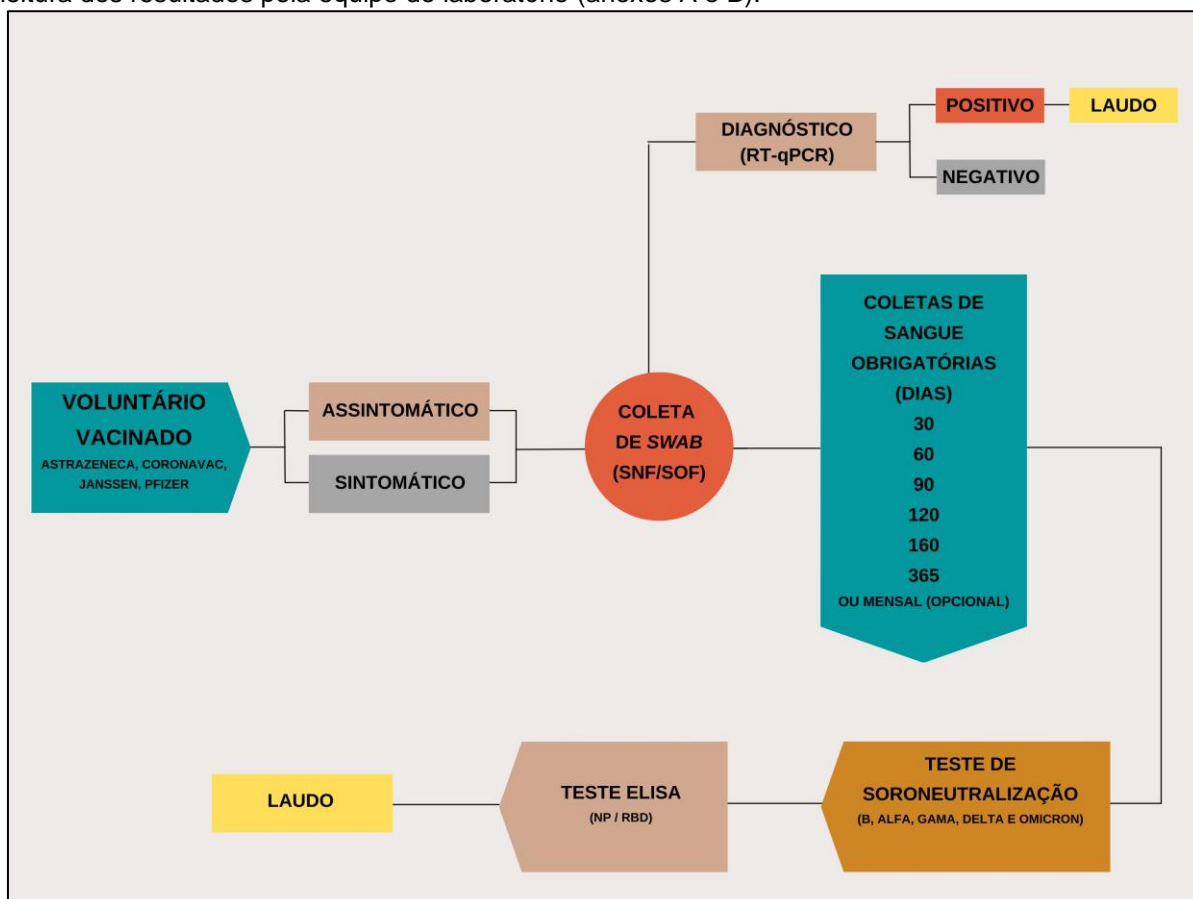
4.1. Amostragem *Swab* – isolamento viral

Amostras de *swab* de nasofaringe (SNP) e/ou Orofaringe (SOF) foram coletadas no laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) e também em pacientes nos seguintes hospitais: Hospital Infantil Cândido Fontoura (HICF), Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), Hospital Municipal da Santa Casa de Misericórdia (HMSCM), Hospital Geriátrico Dom Pedro II (HGDPII-IOS/HMSCM), Hospital São Luiz Gonzaga (HSLG), Hospital Infantil Darcy Vargas (HIDV), Hospital Municipal Infantil Menino Jesus (HMIMJ) e Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Estas amostras fazem parte de um biorrepositório cadastrado sob o número CEP SH 028.2016 e atualizado em 23/08/2022 sob o CAAE 39339920.1.0000.5467 que está sob responsabilidade do professor Dr. Edison Luiz Durigon. É importante lembrar que algumas amostras são do mesmo paciente. As amostras em questão foram enviadas ao LVCM para a realização de diagnóstico e detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, com exceção das enviadas pelo HIAE que foram destinadas exclusivamente para tentativa de isolamento viral. Todas as amostras são provenientes de pacientes adultos que apresentavam sintomas de Covid-19 no momento da coleta e também de profissionais da saúde que eram coletados para controle de infecção (assintomáticos), bem como pacientes pediátricos com infecção das vias aéreas superiores e inferiores (IVAS e IVAI).

4.2. Amostragem de soro – neutralização viral

A amostragem utilizada nos experimentos de neutralização viral é proveniente de profissionais de saúde do HIMJ que foram monitorados por biologia molecular para SARS-CoV-2 desde 2020. A partir de 2021, estes mesmos participantes passaram a coletar soro para determinação de soroconversão pós-vacinas por meio de sorologia. As amostras foram coletadas no próprio hospital, pelo grupo do LVCM e levada no mesmo dia ao laboratório. Participaram também voluntários da comunidade que foram vacinados (cidade de São Paulo) e que aceitaram se dirigir até o LVCM para a coleta mensal de soro ou pelo menos 6 coletas obrigatórias (30, 60, 90, 120, 180 e 360 dias após a primeira dose) como mostra o fluxograma de trabalho na figura 20.

Figura 20 – Fluxograma de trabalho: Voluntários vacinados assintomáticos ou sintomáticos podem realizar coleta de swab de nasofaringe/orofaringe no dia da coleta de sangue. Se o diagnóstico for positivo, recebe um laudo, caso negativo, o laudo não é fornecido. Os voluntários possuem coletas de sangue obrigatórias, mas podem coletar mensalmente caso tenham interesse em acompanhar os resultados. O soro do sangue é utilizado para experimentos de soroneutralização com cepa ancestral e variantes, também utilizado para a realização de Elisa (nucleoproteína e proteína Spike - RBD) relacionado com outros projetos de pesquisa. Os participantes recebem um laudo da sorologia após a leitura dos resultados pela equipe do laboratório (anexos A e B).



Fonte: Autor

Todos os voluntários assinaram o TCLE (anexos C e D) para o início da pesquisa e assinaram também a ficha de coleta mensal como forma de autorizar a utilização do soro coletado para a pesquisa (anexo E). As características da amostragem como sexo, faixa etária, histórico de pré-Covid-19, vacinação e número de doses aplicadas foram obtidas pelo preenchimento do TCLE antes do começo das coletas. Dados como reação adversa às vacinas, sintomas da infecção por Covid-19 e dados pós-infecção foram coletados pelo questionário da coleta mensal e assinado pelo participante.

4.3. Manutenção de cultura celular e isolamento de SARS-CoV-2

Duas linhagens estabelecidas de células Vero foram recebidas por doação e utilizadas nesta pesquisa. Vero E6 (BCRJ) para experimentos relacionados com

isolamento e cinética e Vero CCL-81 (ATCC) para soroneutralização. Ambas são suscetíveis a infecção por SARS-CoV-2. As células foram cultivadas com meio DMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) VITROCELL que contém em sua formulação antibiótico/antimicótico (Sulfato de Gentamicina: 50 mg/L e Anfotericina B: 25 µg/ml), 10% de soro fetal bovino (FBS-Cultilab), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma®) e 1% de piruvato de sódio (Sigma®).

As amostras clínicas foram colocadas em vortex e depois centrifugadas e seu sobrenadante foi utilizado para o isolamento em células Vero E6 e nas passagens iniciais para determinação da viabilidade viral.

Para o isolamento, as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/mL. Após 24 horas, o meio de cultivo foi retirado e o tapete celular lavado três vezes com meio de cultura DMEM sem suplementação. Antes de inoculadas, as amostras foram tratadas com 10% de antibiótico e antifúngico (solução de penicilina e estreptomicina-anfotericina GIBCO, concentração [100x]) e permaneceram na geladeira por 1 hora. Após esse período, foi inoculado 150 µL da amostra clínica em cada poço e realizada a incubação (período de adsorção) em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora. O mesmo foi realizado com o controle negativo, porém foi adicionado 150 µL de meio de cultura no lugar da amostra clínica. Após o período de adsorção, o inóculo foi retirado e em seguida, em cada poço foi adicionado 500-1000 µL de meio de cultura suplementado com 2,5% de SFB. A placa permaneceu na estufa com as mesmas condições citadas acima por no máximo 5 dias ou até o surgimento de efeito citopático (CPE-Cytopathic effect). Diariamente os poços foram observados para verificar a presença de CPE. O sobrenadante foi coletado e realizado RT-qPCR para a confirmação da infecção.

4.4. Extração de ácido nucléico e RT-qPCR em tempo real para detecção SARS-CoV-2

Para realizar a detecção do SARS-CoV-2 nas amostras de *swabs*, a extração do ácido nucléico total (RNA e DNA) foi realizada utilizando a plataforma semi-automática NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, França), seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram manipuladas em laboratório de biossegurança exigida para o novo coronavírus pela OMS nas instalações do Laboratório de Biossegurança Nível 3 Professor Klaus Eberhart Stewien (NB-3) no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A detecção do RNA

viral foi realizada usando o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems Inc., EUA) em uma máquina de PCR em tempo real ABI 7500 SDS (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha), usando sequência de *primers* e sonda para o gene E de SARS-CoV-2 (CORMAN et al., 2020). As cópias de RNA/mL foram quantificadas por RT-qPCR usando um padrão específico de quantificação de RNA transcrito *in vitro* (ARAUJO et al., 2020).

4.5. Imunofluorescência indireta (IFI)

Para demonstração da viabilidade viral através da replicação *in vitro* e determinação de especificidade do ECP segundo as variantes estudadas, foi realizada a técnica de IFI. Resumidamente, 35 horas pós-infecção em células Vero, as placas de 6 poços contendo lamínulas foram fixadas por 20 min a temperatura ambiente com formaldeído 4% (Sigma Formaldehyde - F1635) e Triton X-100 0,2% diluídos em PBS (Phosphate-buffered saline) 1x [pH 7,4]. Em seguida, as células sobre a lamínula foram lavadas com PBST (PBS 1x 0,05% Tween 20), seguindo bloqueio por 30 minutos com solução de bloqueio contendo BSA 3%; Triton X-100 0,1%, diluída em PBS [1X]. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBST e o anticorpo primário originado de um soro de paciente convalescente brasileiro diluído 1:400 em solução bloqueio foi incubado por 1 hora para detectar infecção por SARS-CoV-2. As células foram lavadas com PBST seguindo incubação por 1 hora com anticorpo secundário IgG anti-humano de cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) a 4µg/mL diluído em solução de bloqueio. Após nova lavagem com PBST, as células foram incubadas por 5 minutos com 5µg/mL de Hoechst (Sigma-Aldrich) para marcação do DNA e as lamínulas foram montadas em lâminas usando Prolong Gold (Thermo Fisher). As imagens foram adquiridas usando um microscópio Zeiss Axio Observer 2 Apotome, com objetiva de 63x. Imagens do controle positivo e um isolado de amostra clínica foram adquiridas.

4.6. Neutralização por Efeito Citopático (CPE-VNT)

O método consiste na determinação da presença ou ausência de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2, após infecção natural ou vacina, por meio da observação de efeito citopático (ECP). A técnica foi padronizada com base em metodologia descrita por Nurtop et al. em 2018 (NURTOP et al., 2018), modificada e adaptada para SARS-CoV-2 no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do

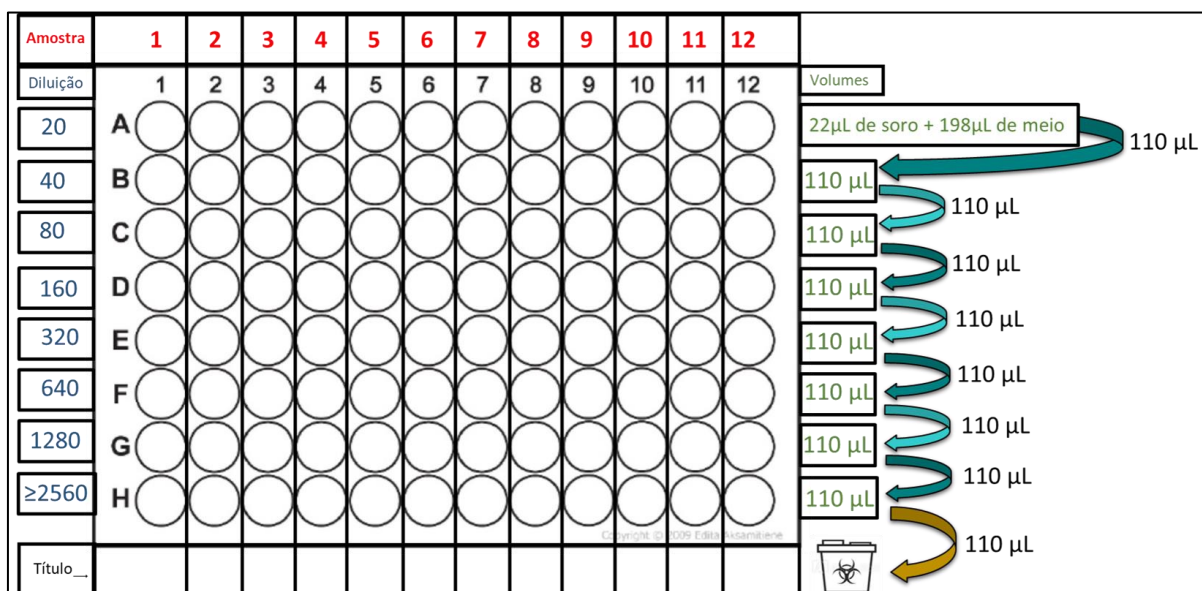
ICB/USP. É necessária a utilização de um isolado viral com efeito citopático claro e bem conhecido pela equipe responsável pela realização da técnica.

Preparação de células: no dia anterior à realização do teste, placas para cultivo celular de 96 poços foram semeadas com células Vero CCL-81 na concentração de 5×10^4 células/mL por orifício.

Diluição dos soros: soros foram diluídos em placas de 96 poços, onde cada coluna representa uma amostra de soro em diferentes diluições.

A diluição inicial foi de 1:10, porém, depois da adição de meio de cultura com vírus a diluição se transformou em 1:20. Como são 8 diluições (de A até H), a última diluição foi de 1:2560. Na linha A foi adicionado 22µL de soro mais 198µL de meio de cultura DMEM suplementado com 2,5% SFB e nas demais linhas (B até H) foi colocado 110µL do mesmo meio. O soro foi homogeneizado e diluído em série na casa 02 (110µL) e os 110µL finais (linha H) desprezados. Assim, todos os poços ficaram com volume final de 110µL (Figura 21). Para cada reação foram utilizados quatro controles: dois controles de vírus (positivo e negativo – sem soro) e dois controles de soro (soro positivo com título previamente conhecido e soro negativo).

Figura 21 – Diluição de soro para VNT. O esquema de placa de 96 orifícios, mostra como é feita a diluição do soro em de meio de cultura para obtenção de 8 diluições.



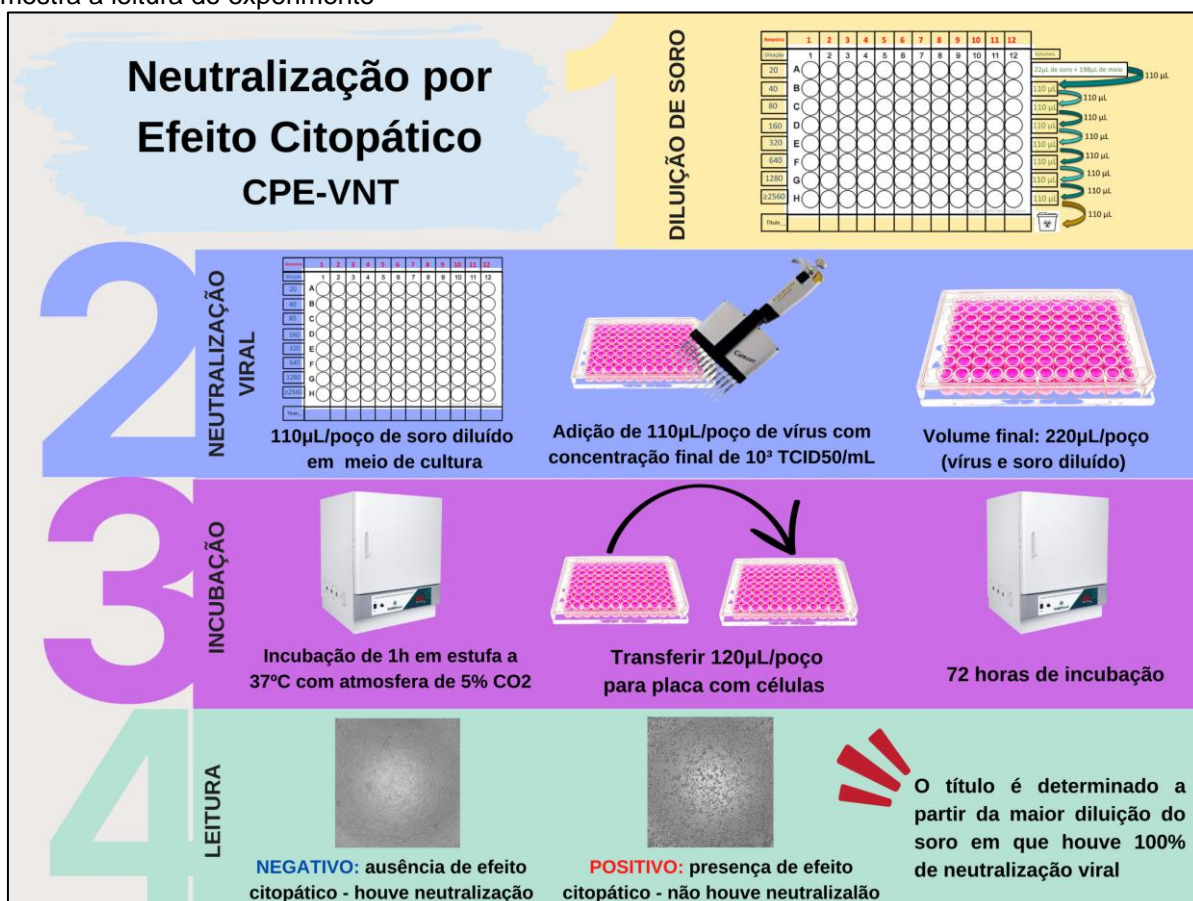
Fonte: Autor

Para a realização da Neutralização Viral frente às variantes de SARS-CoV-2 foram utilizados vírus previamente cultivados em larga escala, titulados e cadastrados no banco de dados de Nucleotídeos do NLM/NCBI ou GISAID (Cepa ancestral: MT350282.1, Gama: EPI_ISL_1060876, Delta: EPI_ISL_2965577, Ômicron:

EPI_ISL_6901961, Zeta utilizada nas microscopias e imunofluorescência: EPI_ISL_770561).

Cada variantes foi diluída separadamente em meio DMEM suplementado com 2,5% SFB de forma a obter no volume final a concentração de 10^3 TCID₅₀/mL. Com vírus já diluído e na concentração de uso, foram distribuídos 110µL em cada poço da placa de diluição que já estavam com o soro adicionado e diluído em série, exceto no controle de vírus negativo que foi adicionado 110µL de meio de cultura sem vírus. Desta forma, a placa ficou com volume final de 220µL, sendo 110µL de meio de cultura com soro diluído e 110µL de meio de cultura com vírus (Figura 22). A placa foi incubada por uma hora em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultivo das placas com células foi retirado e após a incubação, 120µL da mistura de soro e vírus foram transferidos para essas placas com células semeadas no dia anterior. Após a transferência, foram incubadas em estufa com as mesmas condições descritas acima por 72 horas.

Figura 22 – Resumo do experimento. Na primeira etapa há a diluição do soro em meio de cultura. Segunda etapa ocorre a adição de vírus na placa com soro diluído. Terceira etapa há a incubação para neutralização, passagem do material para placa com células e incubação de três dias. Quarta etapa mostra a leitura do experimento



Fonte: Autor

Para a leitura e análise dos resultados, as placas foram levadas ao microscópio óptico e o resultado foi anotado com o símbolo “+” para presença de ECP e “-“ para ausência de ECP. O título foi determinado a partir da maior diluição do soro em que houve 100% de neutralização viral, ou seja, não foi possível visualizar ECP no orifício analisado.

Após a finalização das análises, as placas foram coradas com 100µL/poço de Corante Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich). Em seguida, as placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas com água destilada 3 vezes e secas em temperatura ambiente para confirmação da análise e posterior armazenamento das placas, para futuras análises, caso seja necessário.

4.7. Análises estatísticas e organização dos gráficos

Nos gráficos com três grupos ou mais, não pareados e não paramétricos, foi utilizada a análise estatística *Kruskal-Wallis test*. Nos gráficos com dois grupos, não pareados e não paramétricos, foi utilizada análise estatística *Mann-Whitney test*. Já nos gráficos com dois grupos, pareados e não paramétricos, foi utilizada análise estatística *Wilcoxon test*.

Em todos os casos o valor de P menor que 0,05 foi representado com “ * ”, menor que 0,01 “ ** ”, menor que 0,001 “ *** ” e menor que 0,0001 “ **** ”. Nos gráficos presentes da figura 38 até 55, o título de NAb_s de VNT100 (eixo y) é determinado a partir da maior diluição do soro em que houve 100% de neutralização viral. As barras/pontos representam a média geométrica e os desvios representam 95% de intervalo de confiança. A linha pontilhada representa o limite de detecção da técnica (<20).

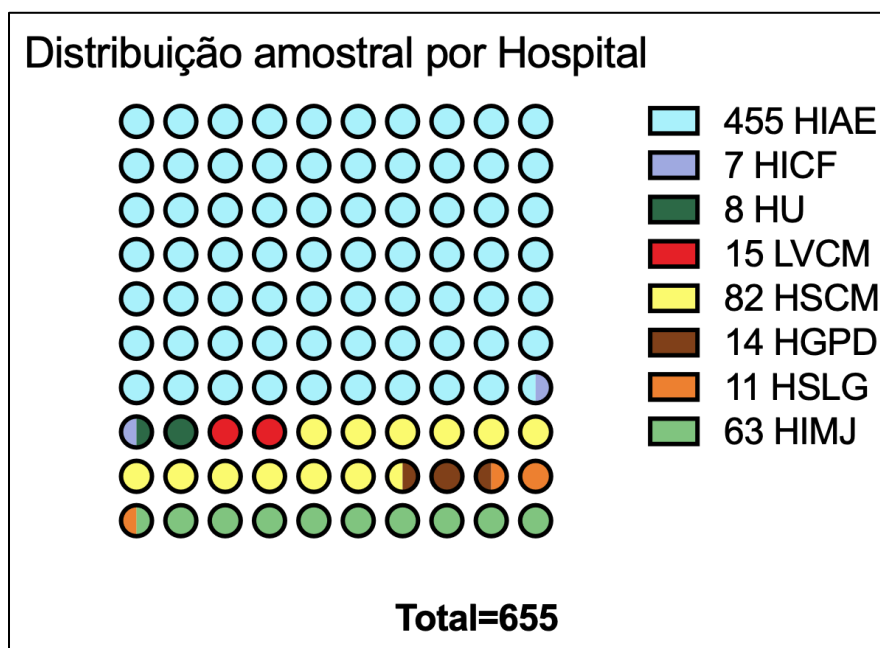
Nos gráficos presentes nas figuras 56, 57 e 58, foi realizada análise de correlação entre título e tempo. Os pontos dispersos representam as amostras testadas. No eixo x estão os dias após a primeira dose da vacina e as três estrelas representam as três vacinas ao longo do tempo. Valores de R² e da correlação estão disponíveis em cada gráfico.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento viral a partir de amostras clínicas

Durante o estudo foram coletadas 816 amostras de SNF/SOF de 655 colaboradores ou pacientes, sendo que provenientes do HIAE foram 455/655 (69,47%), 7/655 (1,07%) do HICF, do HU foram 8/655 (1,22%), do LVCM foram 15/655 (2,29%), 82/655 (12,52%) do HSCM, do HGDP foram 14/655 (2,14%), do HSLG foram 11/655 (1,68%) e 63/655 (9,62%) do HIMJ. A figura 23 mostra a origem de cada amostra recebida pelo LVCM e a quantidade de amostra enviada de cada instituição colaboradora.

Figura 23 – Distribuição amostral de acordo com a instituição colaboradora. O gráfico demonstra, em número absolutos, quantas amostras de pacientes foram enviadas para o LVCM oriundo de cada instituição colaboradora. Abreviações: HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein; HICF: Hospital Infantil Cândido Fontoura; HU: Hospital Universitário (USP); LVCM*: Laboratório de Virologia Clínica e Molecular; HSCM: Santa Casa de Misericórdia; HGDP: Hospital Geriátrico Dom Pedro II; HSLG: Hospital São Luiz Gonzaga; HIMJ: Hospital Municipal Infantil Menino Jesus.



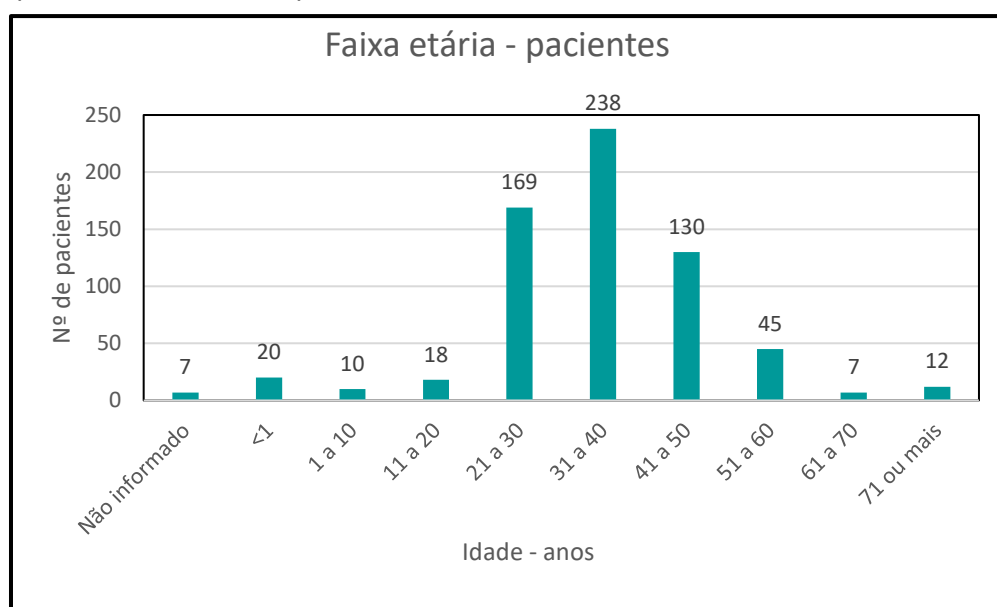
Fonte: Autor

De acordo com a idade dos pacientes as 655 amostras foram divididas em 10 grupos distintos, sendo eles: grupo 1- bebês menores de 1 ano com 20/655 (3%) das amostras; 2- grupo de crianças com idade entre 1 e 10 anos com 10/655 (1,5%) do total de amostras recebidas para o isolamento; 3- adolescentes com idade entre 11 e 20 anos com 18/655 (2,75%) da amostragem; 4- jovens adultos com idade entre 21-30 anos sendo 169/655 (26%) dos positivos; 5- os adultos com idade entre 31 e 40 anos representaram o grupo mais prevalente com 238/655 (36,3%) dos positivos; 6- este

grupo foi constituído de adultos com idade entre 41-50 anos, onde 130/655 (19,8%) foram enviados para isolamento viral; 7- foi constituído por 45/655 (7%) de adultos entre 51-60 anos; 8- obtivemos de jovens idosos com idade entre 61 e 70 anos apenas 7/655 (1%) amostras para isolamento viral; 9- De idosos maiores de 71 anos foram obtidos 12/655 (2%) amostras para isolamento viral. Não foram informadas (NI) as idades de 7/655 (1%) pessoas do estudo.

O gráfico nos mostra que houve uma variação na faixa etária estudada, que foi desde bebês até idosos de 87 anos. Na figura 24 é possível observar a faixa etária destes pacientes e a quantidade de amostras estudadas de cada intervalo de idade.

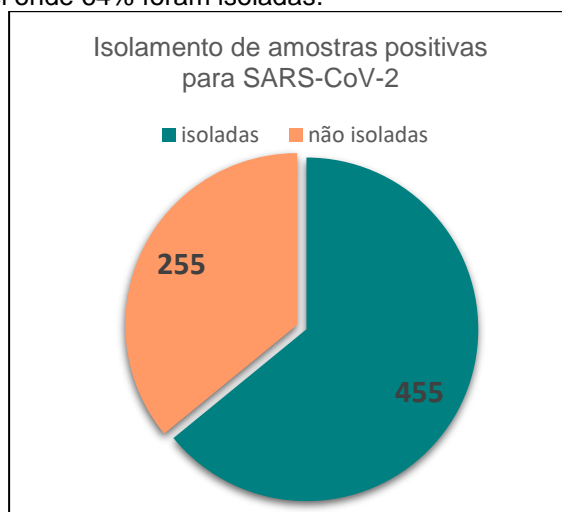
Figura 24 – Distribuição segundo a faixa etária. O gráfico demonstra a faixa etária dos pacientes positivos para SARS-CoV-2 e a quantidade de amostras obtidas em cada uma delas.



Fonte: Autor

As 816 amostras clínicas com diagnóstico clínico e/ou suspeita de Covid-19 foram inoculadas em culturas de célula para o isolamento viral e determinação da viabilidade após dias de sintomas. Das 816 amostras, 605/816 (74,1%) eram a primeira coleta do paciente, 430/605 (71%) delas foram isoladas. As 211/816 (26%) restantes foram de re-coletas, sendo 106/211 (50,2%) de pacientes que já estavam negativos para Covid-19, das quais 5 amostras foram isoladas (4,71%) e dos 105/211 (49,7%) indivíduos que ainda estavam testando positivo para doença, 25/105 (23%) foram isoladas (23%). Das 710 amostras positivas por qPCR, a porcentagem de isolamento foi de 64% (Figura 25).

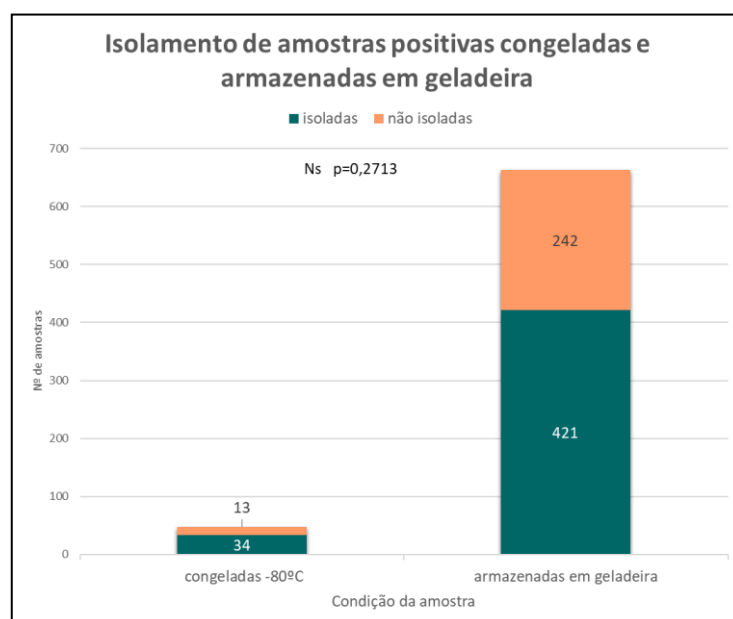
Figura 25 – Determinação de viabilidade viral. O gráfico demonstra em números absolutos o número de amostras com vírus viável onde 64% foram isoladas.



Fonte: Autor

A amostragem possui duas condições de armazenamento diferentes: congeladas em -80°C ou armazenadas em geladeira. Das 710 amostras positivas, 47/710 (6,6%) amostras estavam congeladas e destas 34/47 (72,3%) foram isoladas em cultura celular. Das 663/710 (93,3%) amostras armazenadas em geladeira, 421/663 (63,5%) foram isoladas após o cultivo celular. (Figura 26). Na tabela 4 é apresentado um resumo da distribuição das amostras de acordo com armazenamento, coleta e resultado de qPCR.

Figura 26 – Viabilidade viral x modo de armazenamento da amostra. Foram inoculadas 710 amostras positivas. Destas, 47 estavam congeladas em -80°C após banho de nitrogênio e 663 armazenadas em geladeira. Foram isoladas 72% das amostras congeladas e 63% das amostras armazenadas em geladeira. Foi utilizada análise estatística *Mann-Whitney test*.



Fonte: Autor

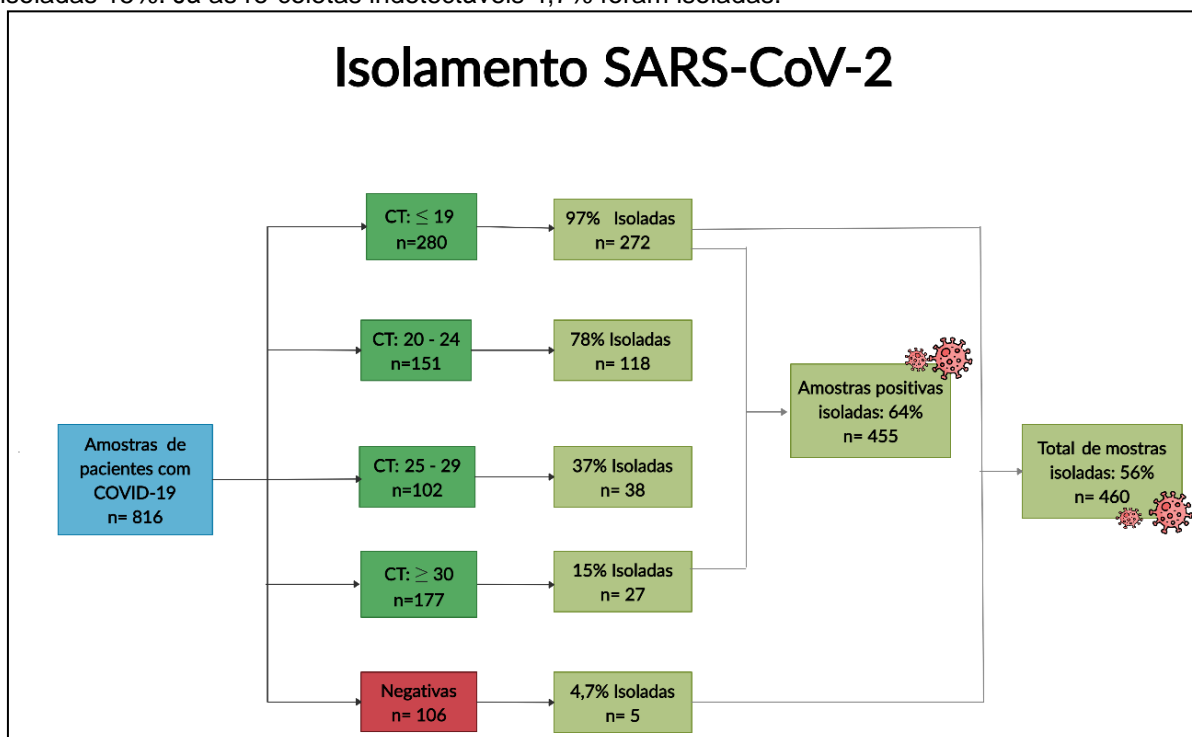
Tabela 4 – Distribuição das amostras de acordo com armazenagem, coleta e resultado de qPCR

Tipo de amostra	Total (n)	Isoladas (n)	Isoladas (%)
Total de amostras inoculadas	816	460	56%
Amostras positivas (total)	710	455	64%
Congeladas (-80°C)	72	36	50%
Em geladeira (entre 2°C e 8°C)	744	424	57%
Primeira coleta	605	430	71%
Re-coletas positivas (HIAE ≥ 7 dias de sintomas)	105	25	23%
Re-coletas que negativaram	106	5	4,71%
Re-coletas (total)	211	-	-

Fonte: Autor

As amostras inoculadas também foram analisadas tomando como referência o *threshold cycle* (*Ct*) das amostras clínicas (Figura 27).

Figura 27 – Isolamento SARS-CoV-2: Quanto menor o *Ct* da amostra clínica, maior a porcentagem de isolamento. Foram isoladas 97% das amostras com *Ct* menor que 19; 78% das amostras com *Ct* entre 20 e 24; 37% das que apresentaram *Ct* entre 25 e 29. As com *Ct* maior ou igual a 30, foram isoladas 15%. Já as re-coletas indetectáveis 4,7% foram isoladas.



Fonte: Autor

Das 280 amostras com carga viral alta (*Ct* ≤19 equivalente a 3,07E+06 cópias/ml, 272 (97%) foram isoladas em cultura celular. Das 151 amostras que possuíam *Ct* entre 20 e 24 com carga viral entre 1,57E+06 e 1,07E+05 cópias/ml, 118 (78%) foram isoladas em cultivo celular. Das 102 amostras com *Ct* entre 25 e 29 com

carga viral entre 5,47E+04 e 3,73E+03 cópias/ml, 38 (37%) tiveram sucesso no isolamento. E das 177 amostras que apresentaram Ct \geq 30 com carga viral menor que 1,9E+03 cópias/ml, somente 27 (15%) apresentaram crescimento viral. Das 106 amostras negativas por qPCR, foi possível o isolamento de 5 destas amostras (4,7%).

A tabela 5 apresenta a totalidade das re-coletas que foram isoladas. Na lista é possível observar tanto as amostras de pacientes que estavam negativos quanto as dos indivíduos que ainda estavam testando positivo para Covid-19.

Tabela 5 – Re-coletas positivas e indetectáveis isoladas em cultura de células. Na primeira coluna há a identificação da amostra; segunda coluna período mínimo infecção, ou seja, número de dias entre a primeira coleta/ou início dos sintomas e a re-coleta isolada; na terceira há o Ct da amostra clínica; na quarta é apresentado o Ct da primeira cultura de célula (T0); e quinta mostra o Ct da passagem (T1), quando houve. Abreviações: NR - não realizado.

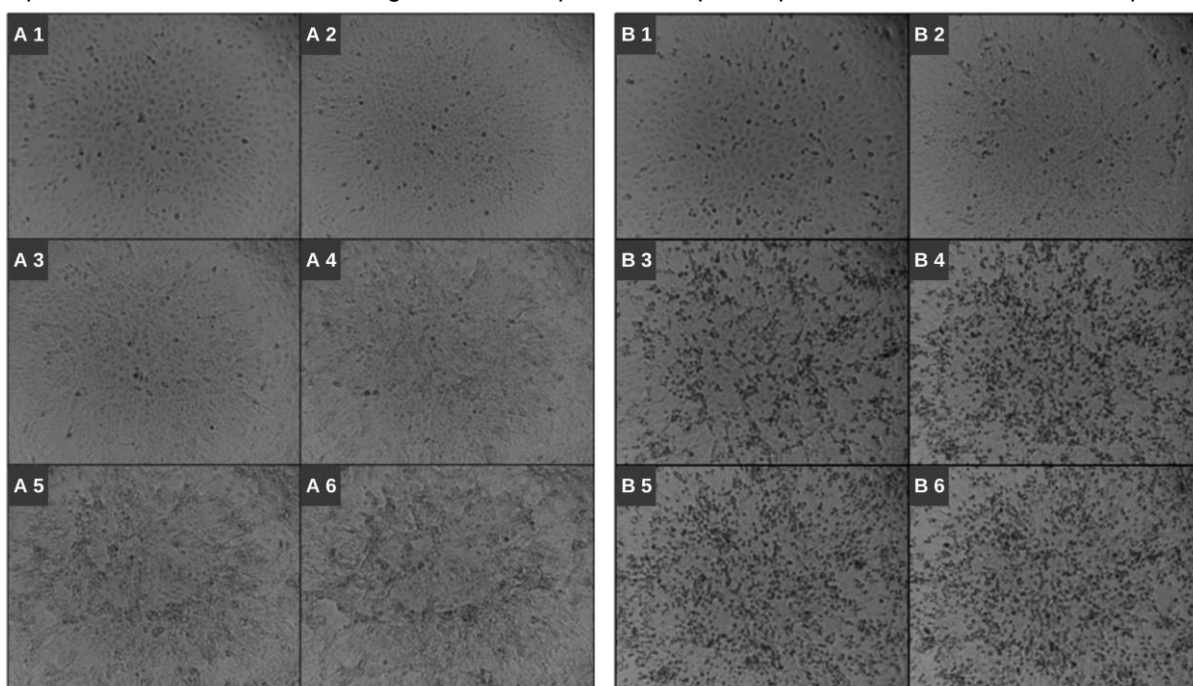
Amostra	Dias de infecção	Ct da amostra	Ct cultura T0	Ct cultura T1
cov 70a	27 dias	indetectável	29.04	14.83
pac 241b	13 dias	indetectável	21.59	16.38
cov 321a	11 dias	indetectável	30.94	14.82
cov 160a	10 dias	indetectável	22.09	18.07
cov 236a	9 dias	indetectável	27.29	16.1
Painel 1378	11 dias	20.15	27.8	16.5
cov 401a	11 dias	31.55	16.53	NR
cov 589a	16 dias	32.02	18.91	16.38
pac 241a	7 dias	34.22	23.42	NR
pac 67a	10 dias	34.5	30	10.22
cov 90a	14 dias	36.5	21.87	14.94
cov 90b	18 dias	38.99	30.19	13.22
cov 90c	22 dias	39.16	17.85	NR
RRSLS	7 dias	37.05	30.4	NR
VASR	7 dias	19.52	13,62	NR
FAGS	8 dias	26.49	36,68	NR
JL	10 dias	23.2	16.9	NR
RASA	10 dias	18.86	12.28	NR
FAD	11 dias	15.77	15.44	NR
FGAR 05/11	13 dias	35.4	26.03	NR
EATA	13 dias	29.3	15.89	NR
WHC	14 dias	15.8	15.05	NR
PFG	14 dias	33.55	27.39	NR
MAC	16 dias	16.82	14.7	NR
DCJ 09/12	20 dias	31.05	16.55	NR
RCFP 20/11	25 dias	42.3	27.18	NR
SCC 20/11	29 dias	40.1	29.2	NR
WSS 08/12	31 dias	40.2	15.26	NR
LFC 13/08	36 dias	40.8	29.32	NR
LFP 27/10	39 dias	40.6	34.2	NR

Fonte: Autor

5.2. Efeito Citopático, Cinética de SARS-CoV-2 e Imunofluorescência

Para visualização do ECP e cinética viral, foi utilizado o *Incubator Microscope zenCELL owl*. O equipamento fotografou a placa com células cada 10 minutos pelo tempo de no máximo 140 horas. As fotografias foram feitas automaticamente pelo equipamento e ficaram armazenadas em um computador. Com estas imagens foi possível realizar um vídeo mostrando a evolução do efeito citopático provocado pelo SARS-CoV-2. A figura 28 apresenta imagens do crescimento da célula Vero-E6 sem inoculação viral (controle negativo – Apêndice A) e a evolução do efeito citopático da célula Vero-E6 infectada pelo Sars.Cov-2 (controle positivo, cepa ancestral - Apêndice B).

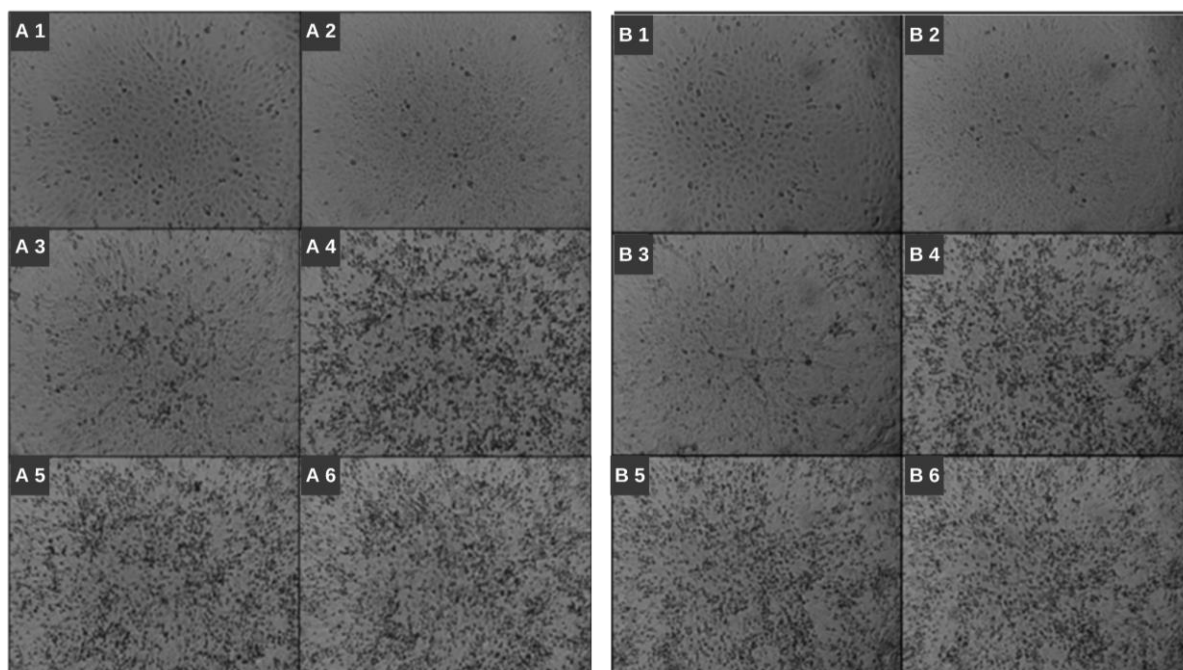
Figura 28 – Microscopia (10x) de células Vero com efeito citopático causado por SARS-CoV-2 e controle negativo. Tempo 1- dez minutos após a infecção; 2- vinte quatro horas; 3- 48 horas; 4- 72 horas; 5- 96 horas; 6- 120 horas. **A:** controle negativo. As imagens de microscopia mostram o crescimento das células do tapete celular e o acúmulo destas com o decorrer do tempo. **B:** controle positivo mostrando efeito citopático causado por SARS-CoV-2. Nos tempos 1 e 2 as células estão com aspecto similar ao do controle negativo. Do tempo 3 ao tempo 6 é possível observar o efeito citopático.



Fonte: Autor

Em seguida, na figura 29 é apresentada a mesma análise das amostras “pac 67a” (Apêndice C) e “cov 70a” (Apêndice D). As amostras “cov 160a”, “cov 589a”, “Painel 1378”, “cov 90a” e “cov 90b” também foram fotografadas (não mostradas aqui) e, nesta resolução de imagem, apresentaram o mesmo padrão de efeito citopático. Utilizando objetiva 10x, também foram realizadas filmagens dos controles positivos das variantes Gama e Zeta (Apêndices E e F) (não mostrados aqui).

Figura 29 – Microscopia (10x) de células Vero com efeito citopático causado por SARS-CoV-2. Tempo 1- dez minutos após a infecção; 2- vinte quatro horas; 3- 48 horas; 4- 72 horas; 5- 96 horas; 6- 120 horas. **A:** amostra “pac 67a”, amostra clínica de paciente assintomático com aproximadamente 10 dias de infecção. Nos tempos 1 e 2 as células estão com aspecto similar ao do controle negativo (Figura 28 A). No tempo 3 é possível observar pouca intensidade de efeito. Do tempo 4 ao tempo 6 o efeito é mais claro e com maior intensidade. **B:** amostra “cov 70a”, amostra clínica de paciente sintomático com aproximadamente 27 dias de infecção. Nos tempos 1 e 2 as células estão com aspecto similar ao do controle negativo (Figura 28 A). No tempo 3 é possível observar pouca intensidade de efeito. Do tempo 4 ao tempo 6 o efeito é mais claro e com maior intensidade.

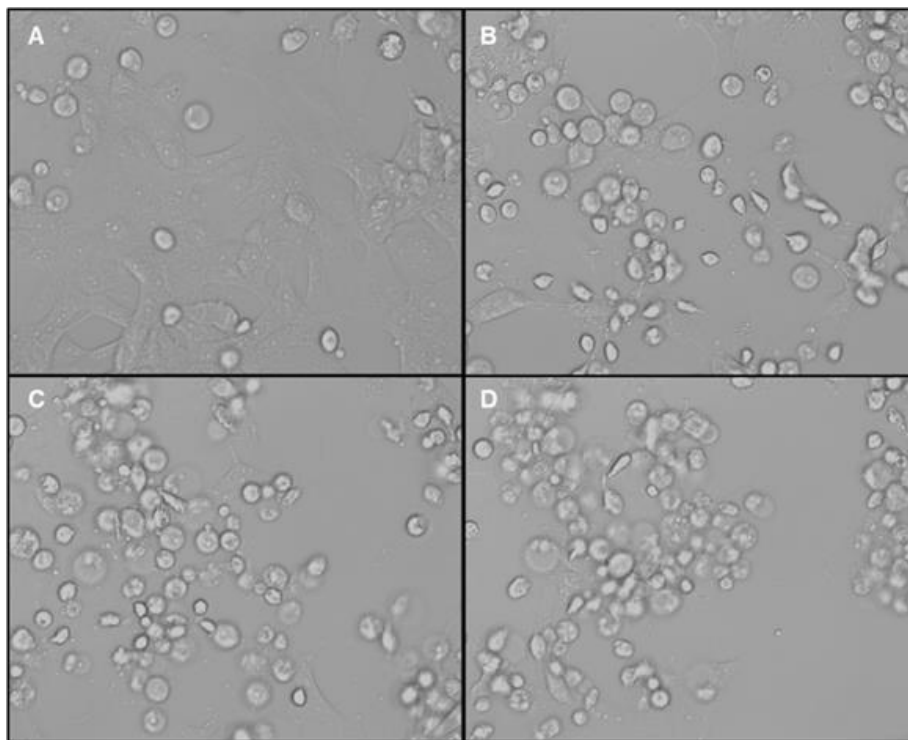


Fonte: Autor

O controle positivo (Apêndice G) e a amostra “cov 589a” (Apêndice H) foram fotografados com um microscópio de alta resolução (*Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome*) utilizando a objetiva de 63x. Com as imagens foi possível comparar o padrão da formação do efeito citopático entre os dois inóculos. No controle positivo (Figura 30) as células apresentaram formação de efeito citopático característico do Sars.Cov-2 e a amostra clínica “cov 598 a” apresentou formação de ponte citoplasmática seguida do desprendimento celular, evoluindo para o ECP característico de Sars.Cov-2 (Figura 31). Também foi realizada filmagem de controle negativo utilizando a objetiva 63x (não mostrado aqui) (Apêndice I).

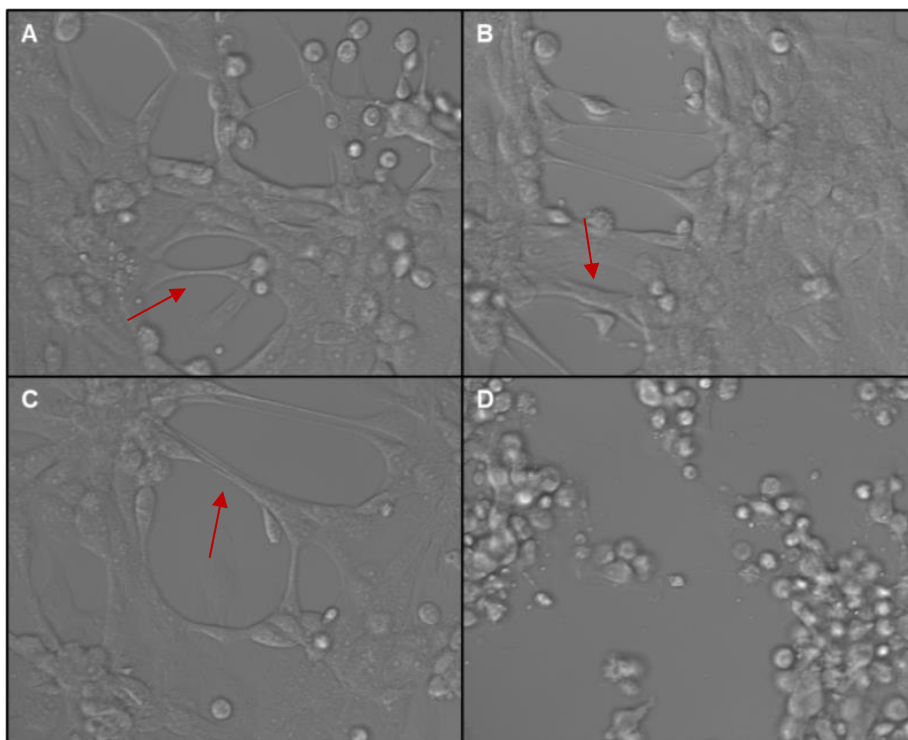
Com o mesmo equipamento foram feitas imagens de imunofluorescência do controle positivo (Figura 32) e amostra “cov 589a” (Figura 33). A região do núcleo aparece em azul pelo *Hoechst (Sigma-Aldrich)* e o vírus no citoplasma aparece em verde pelo anticorpo humano anti-SARS-CoV-2 conjugado com *Alexa Fluor 488*. Também foram adquiridas imagens dos controles positivos das variantes Gama e Zeta onde as junções intercelulares aparecem em vermelho (Figura 34 e Figura 35).

Figura 30 – Microscopia (63x) de célula Vero com efeito citopático causado pelo SARS-CoV-2 (controle positivo) mostrando mudanças morfológicas observadas em amostras positivas para o vírus. A, B, C e D são diferentes campos fotografados.



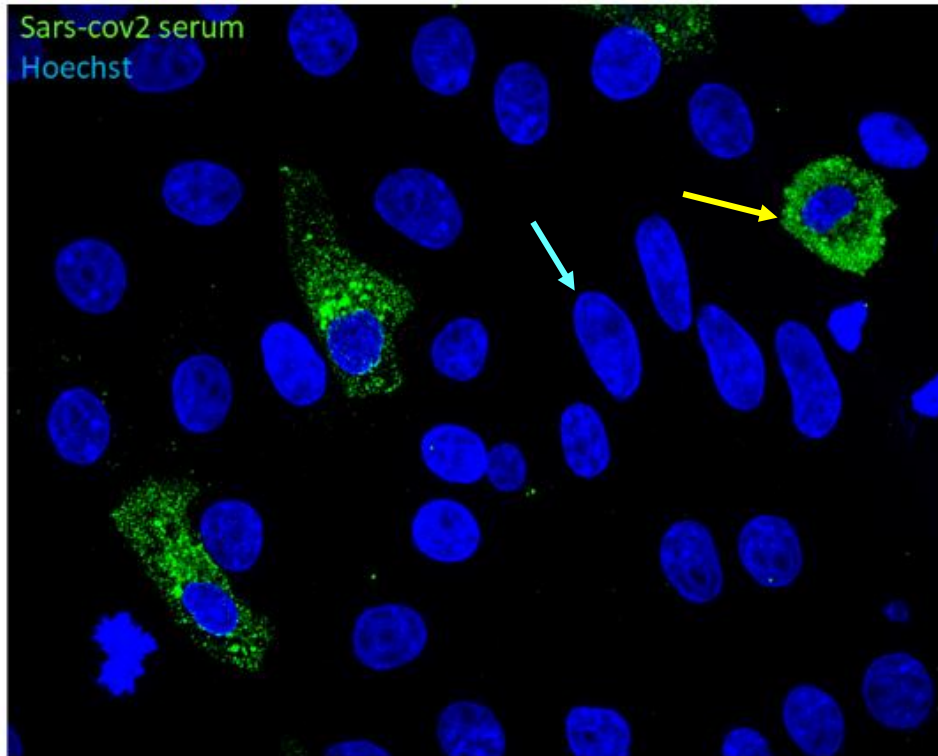
Fonte: Autor

Figura 31 – Microscopia (63x) de célula Vero com efeito citopático causado pelo SARS-CoV-2 (amostra “cov589a”). A, B e C são diferentes campos fotografados e é possível ver a formação de pontes citoplasmáticas (setas vermelhas) em três campos diferentes, não observado no controle positivo.



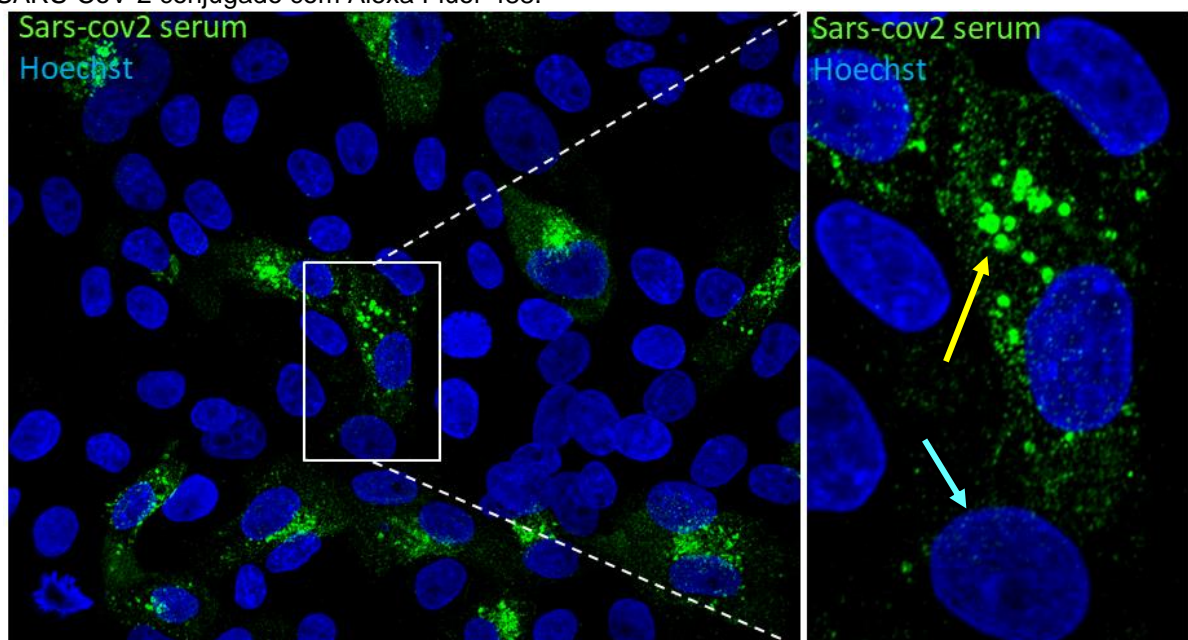
Fonte: Autor

Figura 32 – Microscopia de imunofluorescência de células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2. As imagens foram adquiridas usando o *Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome* com objetiva de 63x. Microscopia realizada a partir do controle positivo. A região do núcleo aparece em azul pelo Hoechst (Sigma-Aldrich) (seta azul) e o vírus no citoplasma aparece em verde (seta amarela) pelo anticorpo humano anti-SARS-CoV-2 conjugado com Alexa Fluor 488.



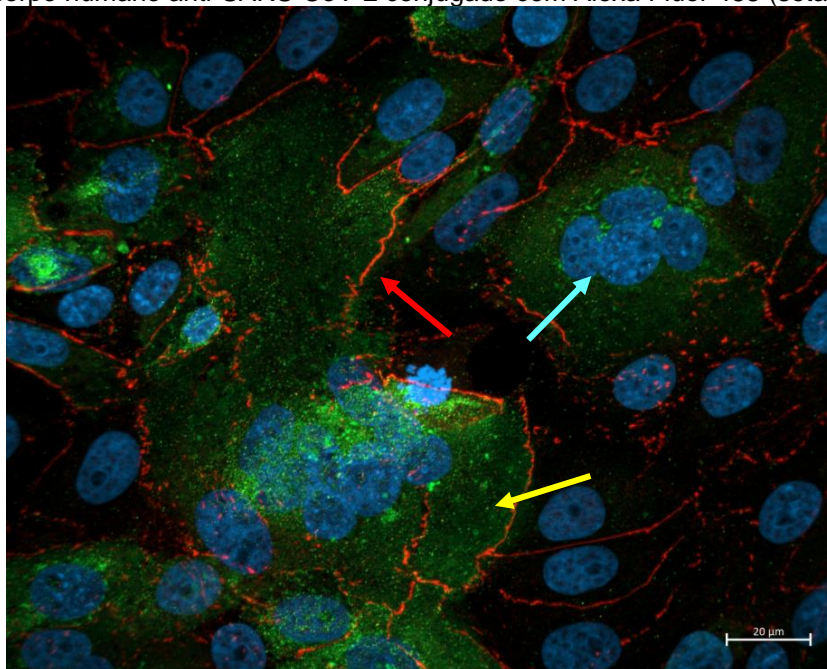
Fonte: Autor

Figura 33 – Microscopia de imunofluorescência de células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2. As imagens foram adquiridas usando o *Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome* com objetiva de 63x. No campo de maior ampliação é possível observar as vesículas em detalhes (seta amarela). Microscopia realizada a partir da amostra "cov 589a". A região do núcleo aparece em azul (seta azul) pelo Hoechst (Sigma-Aldrich) e o vírus no citoplasma aparece em verde pelo anticorpo humano anti-SARS-CoV-2 conjugado com Alexa Fluor 488.



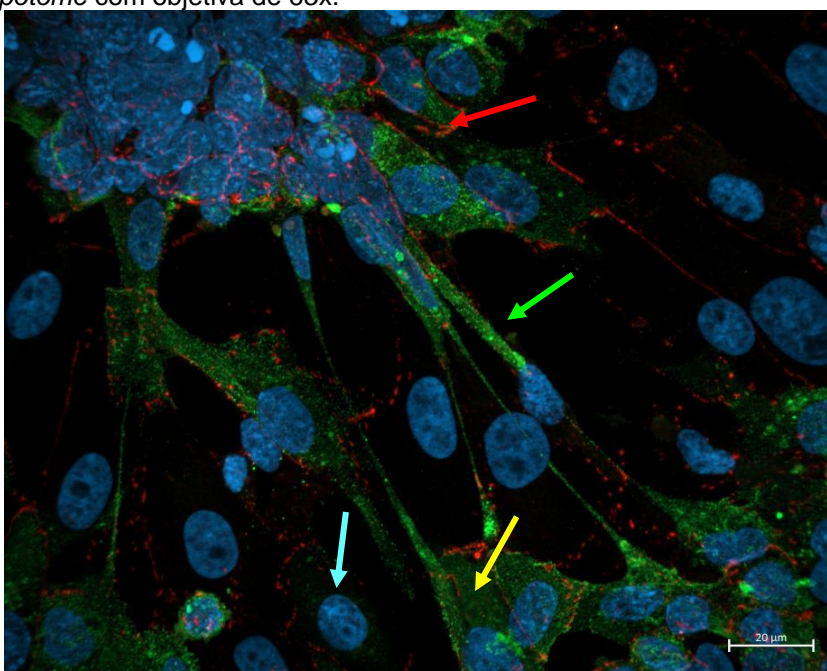
Fonte: Autor

Figura 34 – Microscopia de imunofluorescência de células Vero-CCL 81 infectadas com SARS-CoV-2. Variante Zeta utilizada como controle positivo. Na imagem é possível observar células multinucleadas (seta azul). A imagem foi adquirida usando o *Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome* com objetiva de 63x. Na imagem há junções intercelulares em vermelho (Zo-1) (seta vermelha), a região do núcleo aparece em azul pelo Hoechst (Sigma-Aldrich) e o vírus aparece em verde pelo anticorpo humano anti-SARS-CoV-2 conjugado com Alexa Fluor 488 (seta amarela).



Fonte: Autor

Figura 35 – Microscopia de imunofluorescência de células Vero-CCL 81 infectadas com SARS-CoV-2. Variante Gama utilizada como controle positivo nos experimentos de CPE-VNT. Na imagem é possível observar a formação de pontes citoplasmáticas (seta verde). Na imagem há junções intercelulares em vermelho (Zo-1) (seta vermelha), a região do núcleo aparece em azul pelo *Hoechst* (Sigma-Aldrich) (seta azul) e o vírus aparece em verde pelo anticorpo humano anti-SARS-CoV-2 conjugado com Alexa Fluor 488 (seta amarela). A imagem foi adquirida usando o *Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome* com objetiva de 63x.



Fonte: Autor

5.3. Neutralização por Efeito Citopático (CPE-VNT):

A amostragem foi analisada de duas maneiras. A primeira considerou cada amostras isoladamente e a segunda se refere à última ou única coleta de cada indivíduo, como apresentado na tabela 6.

Tabela 6 – Características da amostragem: sexo, faixa etária, histórico de Covid-19, histórico de vacinação, número de doses.

Sexo	Amostras	Participantes
Feminino	2417	508
Masculino	857	168
Faixa etária	Amostras	Participantes
18 a 20	130	20
21 a 40	2161	439
41 a 65	890	183
66 ou mais	77	23
Não informada	16	11
Histórico de Covid-19	Amostras	Participantes
Sem histórico	2448	442
Com histórico - total	826	234
Com histórico de 1 infecção	798	221
Com histórico de 2 infecções	28	13
Vacinação	Amostras	Participantes
Pré-vacina	48	44
Vacinados	3226	676
Número de doses	Amostras	Participantes
Uma dose	875	86
Duas doses	1659	314
Três doses	692	276
Total	3274	676

Fonte: Autor

Dos 676 participantes, 508/676 (75,1%) amostras foram coletadas de voluntários do sexo feminino, grupo do qual foram obtidas 2417/3274 (73,9%) amostras. E 168/676 (24,8%) de indivíduos do sexo masculino, que forneceram 857/3274 (26,1%) amostras, totalizando 3274 amostras coletadas

A faixa etária dos integrantes variou entre 18 e 78 anos. Considerando a idade da última ou única amostra coletada de cada pessoa, a amostragem contou com 20/676 (3%) participantes com idade entre 18 e 20 anos, somando 130/3274 amostras. Indivíduos de 21 a 40 anos foram 439/676 (65%), contabilizando 2161/3274 amostras representando o maior grupo. Foram recebidas 183/676 (27%) pessoas de 41 a 65 anos, somando 890/3274 amostras. Material de pessoas com 66 anos ou mais, foram

77/3274 advindas de 23/676 participantes (3,5%). Integrantes que não informaram a idade foram 11/676 (1,6%), contabilizando 16/3274 amostras.

No início da pesquisa em 2020, foi perguntado no TCLE (anexos C e D) sobre o histórico de Covid-19 e durante as coletas de sangue, no decorrer da pesquisa (2021-2022), os dados foram atualizados através da ficha de coleta (anexo E) e dos resultados da qPCR, teste de antígeno e testes rápido feito pelos participantes no LVCM ou fora dele. Quatrocentos e quarenta e duas pessoas/676 (65,4%) não tiveram a Covid-19 durante todo o estudo. Destas pessoas, foram coletadas 2448/3274 (74,7%) amostras. Já 234/676 (34,6%) pessoas tiveram a infecção, destes indivíduos foram coletadas 826/3274 (25,2%) amostras. Entre os 234/676 participantes com histórico prévio de Covid-19, 13/234 (5,5%) tiveram reinfecções, dos quais foram coletadas 28/826 amostras. E os 221/234 (94,4%) indivíduos que tiveram a infecção apenas uma vez, forneceram 798/826 amostras.

Das 3274 amostras utilizadas na pesquisa, 48/3274 (1,46%) delas eram de pessoas que forneceram sangue antes de serem vacinadas com a primeira dose, denominadas de “pré-vacina”. Já as outras 3226/3274 (98,86%), são de 676 participantes vacinados com pelo menos uma dose.

Das 3226/3274 amostras de pessoas vacinadas, 875/3226 (27,1%) eram referentes a 86/826 pessoas com apenas uma dose da vacina. Com duas doses, foram coletadas 1659/3226 (51,4%) amostras de 314/826 indivíduos. E com três doses, 692/3226 (21,4%) amostras de 276/826 participantes.

Dentre as 3226/3274 (98,3%) amostras de indivíduos vacinados, há participantes que receberam as seguintes vacinas: AstraZeneca, CoronaVac, Pfizer e Janssen, como disposto na tabela 7.

Foram analisadas 875/3226 (27,1%) amostras de participantes que receberam a primeira dose da vacina. Sendo 158/875 (18%) de participantes que receberam AstraZeneca, 44/875 (5%) de CoronaVac, 576/875 (65,8%) de Pfizer e 97/875 (11%) de Janssen. Já com duas doses, foram utilizadas 1659/3226 (51,4%) amostras: 202/1659 (12,1%) de pessoas vacinadas com AstraZeneca/AstraZeneca (Az/Az), 808/1659 (48,7%) com CoronaVac/CoronaVac (Cv/Cv), 612/1659 (36,8%) com Pfizer/Pfizer (Pf/Pf) e 37/1659 (2,2%) com Janssen/Pfizer (Js/Pf). Por último, 692/3226 (21,4%) amostras de vacinados com três doses. Na amostragem existem onze combinações diferentes de vacinação. As combinações com maior número de

amostras são AstraZeneca nas duas primeiras doses e Pfizer na terceira, CoronaVac nas primeiras e Pfizer na terceira, e Pfizer nas três doses.

Tabela 7 – Distribuição de amostras de acordo com o histórico de vacinação

1ª dose		Número de amostras
AstraZeneca		158
CoronaVac		44
Pfizer		576
Janssen		97

1ª dose	2ª dose	Número de amostras
AstraZeneca	AstraZeneca	202
CoronaVac	CoronaVac	808
Pfizer	Pfizer	612
Janssen	Pfizer	37

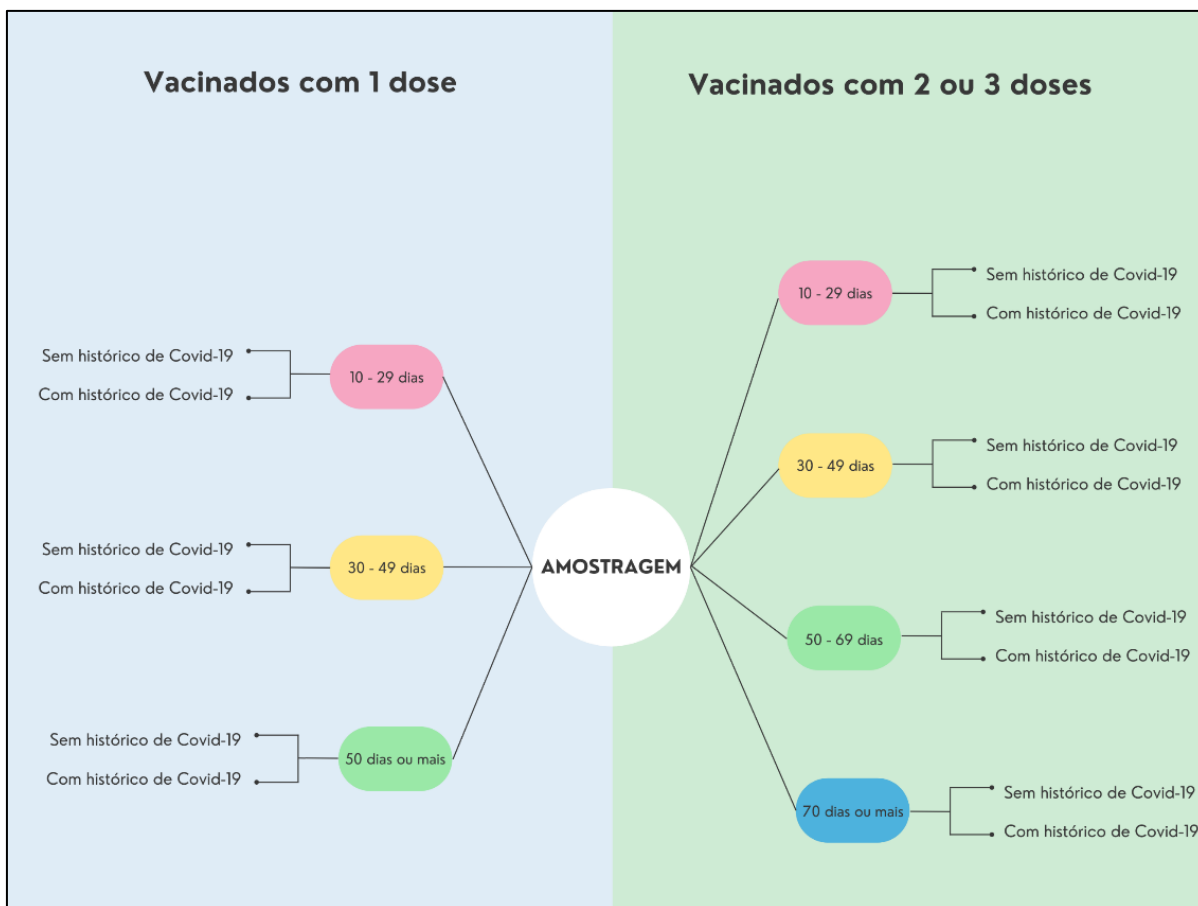
3ª dose combinações

1ª dose	2ª dose	3ª dose	Número de amostras
AstraZeneca	AstraZeneca	CoronaVac	1
AstraZeneca	AstraZeneca	Janssen	1
AstraZeneca	AstraZeneca	Pfizer	68
CoronaVac	CoronaVac	AstraZeneca	9
CoronaVac	CoronaVac	CoronaVac	1
CoronaVac	CoronaVac	Janssen	3
CoronaVac	CoronaVac	Pfizer	251
Pfizer	Pfizer	AstraZeneca	13
Pfizer	Pfizer	CoronaVac	3
Pfizer	Pfizer	Janssen	16
Pfizer	Pfizer	Pfizer	326
Total			3226

Fonte: Autor

As amostras foram organizadas pelo tempo entre vacinação e coleta de sangue. Em cada agrupamento há apenas uma amostra por participante. Quando se trata das análises de vacinados com apenas uma dose, foram construídos três agrupamentos de tempo: 10-29 dias, 30-49 e maior ou igual a 50 dias. Já com as análises de vacinados com duas ou três doses, foram realizados quatro agrupamentos: 10-29 dias, 30-49, 50-69 e maior ou igual a 70 dias. Além dos agrupamentos descritos, ainda existem dois subgrupos em cada agrupamento: sem histórico de Covid-19 e com histórico da doença (Figura 36), exceto nas análises de faixa etária, que por conter quantidade de amostras muito baixa, não foi possível realizar os dois subgrupos relacionados com histórico de Covid-19. Em alguns casos, os agrupamentos ou subgrupos não tiveram número de amostras suficientes para obter uma análise significativa, por isso não foram apresentados.

Figura 36 – Fluxograma de organização de amostras: Em cada agrupamento há apenas uma amostra por participante. Quando se trata das análises com vacinados com apenas uma dose, foram construídos três agrupamentos de tempo (10-29 dias, 30-49 e maior ou igual a 50 dias). Já com as análises de vacinados com duas ou três doses, foram realizados quatro agrupamentos (10-29 dias, 30-49, 50-69 e maior ou igual a 70 dias). Além dos agrupamentos descritos, ainda existem dois subgrupos em cada agrupamento (sem histórico de Covid-19 e com histórico da doença).

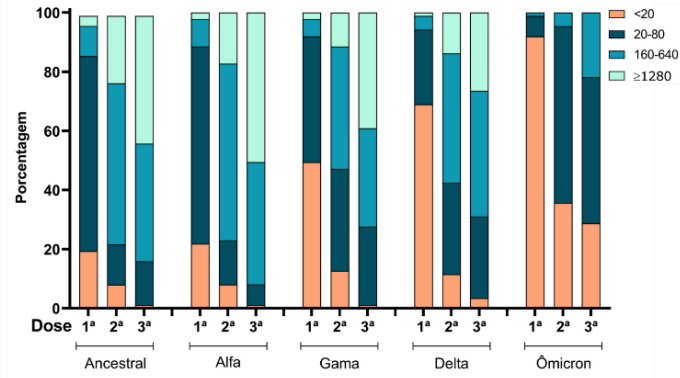


Fonte: Autor

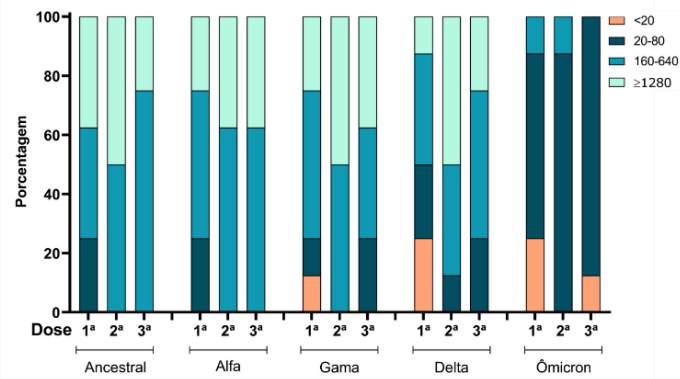
A figura 37 apresenta a comparação entre doses de vacinas contra Covid-19 a partir da análise de soros de 87 participantes, testados com cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron.

Figura 37 – Comparação entre doses de vacinas contra Covid-19: Foram realizadas a partir da análise de soros de 87 participantes, testados com cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. Eixo y apresenta a porcentagem de títulos de CPE-VNT que estão representados por diferentes cores nas barras dos gráficos. O título é determinado a partir da maior diluição do soro em que houve 100% de neutralização viral. No eixo x há número de doses de vacinas e variantes utilizadas nos experimentos. A- Apresentação da análise de amostras de 87 pessoas vacinadas com três doses da vacina, acompanhados desde a aplicação da primeira dose. Neste grupo há participantes com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Também estão os que se infectaram durante o andamento da pesquisa. B- Resultado da análise de soros de 8 integrantes com histórico prévio de Covid-19 `a aplicação da primeira dose da vacina. C- Exibição dos resultados da análise do soro de 44 indivíduos sem histórico de Covid-19. Análises de participantes que tiveram infecção durante o período da pesquisa estão apresentadas apenas no gráfico A.

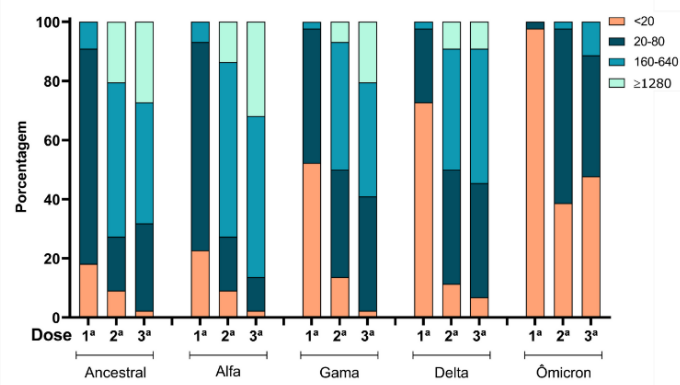
A Participantes com e sem histórico de Covid-19



B Participantes com histórico de Covid-19 desde a primeira coleta de sangue



C Participantes sem histórico de Covid-19



Todos os participantes que foram acompanhados durante o período da pesquisa e que possuíam amostras referentes às três doses de vacinas e análise para todas as variantes citadas, tiveram suas amostras analisadas e representadas no gráfico A da figura 37. Nessa análise estão os indivíduos que se encaixam em três condições diferentes: 1- voluntários com histórico de Covid-19 anterior à primeira vacinação; 2- participantes que se infectaram durante o andamento da pesquisa; 3- e indivíduos sem histórico da doença.

Nessa análise é visível que a porcentagem de amostras com resultado abaixo do limite de detecção para títulos neutralizantes (<20, representado pela cor laranja) diminuiu ao passo que foram aplicadas doses de vacinas. Também é possível perceber que existe maior concentração destes títulos <20 quando se trata das variantes Gama, Delta e principalmente Ômicron. O inverso ocorre com títulos mais altos representados pela cor verde claro, conforme as doses são aplicadas, a porcentagem de títulos maior ou igual 1280 aumentam, exceto com a variante Ômicron, que não gerou títulos acima de 640.

O gráfico B da figura 37 apresenta a análise realizada com amostras de oito participantes com histórico de Covid-19 prévio à aplicação da primeira dose da vacina. Foi observado em alguns pontos a presença de títulos <20: nas colunas referentes à primeira dose, testadas com variantes Gama, Delta e Ômicron, 12%, 25% e 25% respectivamente. E 12% referente à terceira dose, testada com variante Ômicron. Já os títulos ≥ 1280 aparecem em maior porcentagem nas colunas referentes à segunda dose de vacina, com exceção das amostras testadas com variantes Ômicron.

A mesma análise foi realizada com amostras dos 44 integrantes acompanhados que não tiveram histórico de Covid-19 e o resultado é muito similar ao gráfico A da figura 37, enquanto a porcentagem de título <20 diminui ao passo que são aplicadas as vacinas, a porcentagem de títulos maior ou igual 1280 aumentam, exceto com a variante Ômicron, que não gerou títulos acima de 640 (gráfico C da figura 37).

Os gráficos da figura 38 representam a comparação entre cepa ancestral e variantes, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, por ser uma análise referente a vacinados com uma dose de vacina, existem três agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação (Figura 38 quadro A e B), 30 a 49 dias (Figura 38 quadro C e D) e

maior ou igual a 50 dias (Figura 38 quadro E e F). Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da infecção. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Na figura 38 quadro A, voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, a média geométrica de títulos obtidos permaneceu entre 10 (Ômicron) e 24 (Alfa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a média geométrica da cepa ancestral e variantes Alfa, Gama e Delta. Houve diferença estatisticamente significativa na média geométrica apenas entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No gráfico B, participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, a média geométrica de títulos variou entre 36 para Ômicron e 694 para Alfa. Como no quadro A, aqui também apresentou diferença significativa somente entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No quadro C, indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, a média geométrica do título, ficou entre 10 para Ômicron e 34 para a cepa ancestral. Houve diferença estatisticamente significativa entre a cepa ancestral e todas variantes testadas, com exceção da variante Alfa.

No quadro D, participantes com histórico de Covid-19, coleta de sangue entre 30 e 49 dias, a média geométrica variou entre 34 para Ômicron e 569 para cepa ancestral e houve diferença apenas entre cepa ancestral e variante Ômicron.

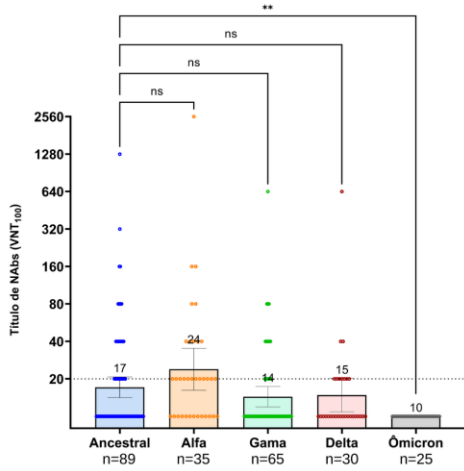
No quadro E, voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, a média geométrica dos títulos neutralizantes ficou entre 11 para Ômicron e 34 para Alfa. Houve diferença estatisticamente significativa entre a cepa ancestral e todas variantes testadas, com exceção da variante Alfa.

Já no grupo F, indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, a média geométrica dos títulos variou entre 48 para Ômicron e 609 para Alfa. Houve diferença entre a cepa ancestral com a variantes Ômicron e Delta.

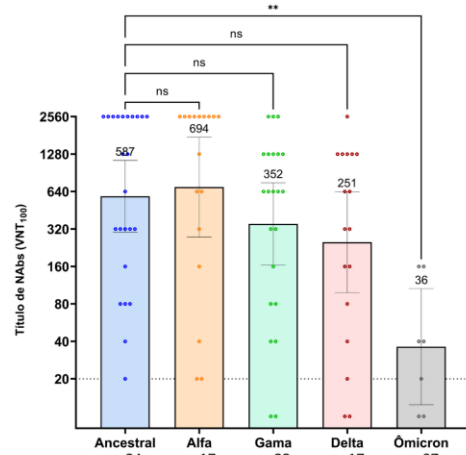
Figura 38 – Comparação entre cepa ancestral e variantes do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A e B - Indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em A- sem histórico de Covid-19 e B- com Covid-19 prévio. C e D - Indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em C- sem histórico de Covid-19 e D- com Covid-19 prévio. E e F - Indivíduos com coleta de sangue \geq 50 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em E- sem histórico de Covid-19 e F- com Covid-19 prévio.

10 a 29 dias

A Sem histórico de Covid-19

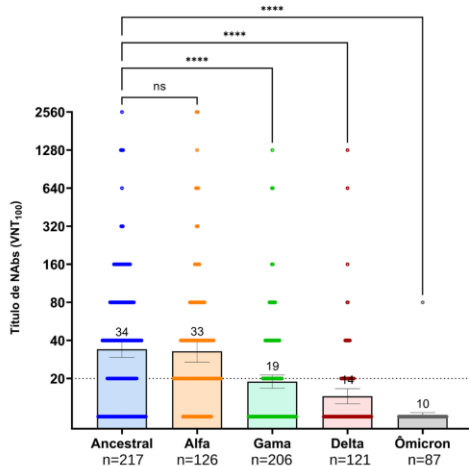


B Com histórico de Covid-19

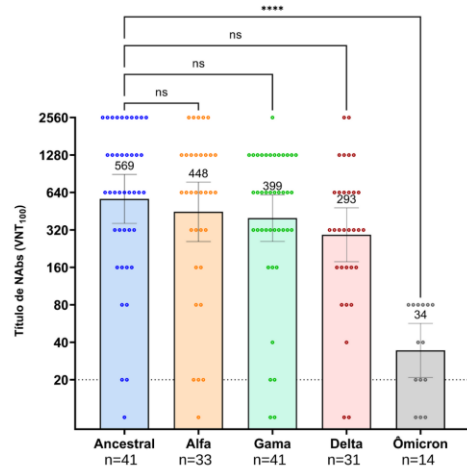


30 a 49 dias

C Sem histórico de Covid-19

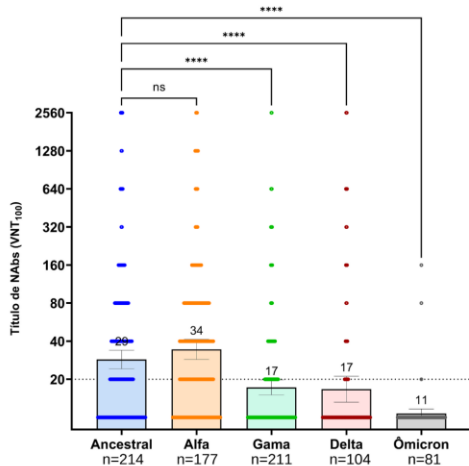


D Com histórico de Covid-19

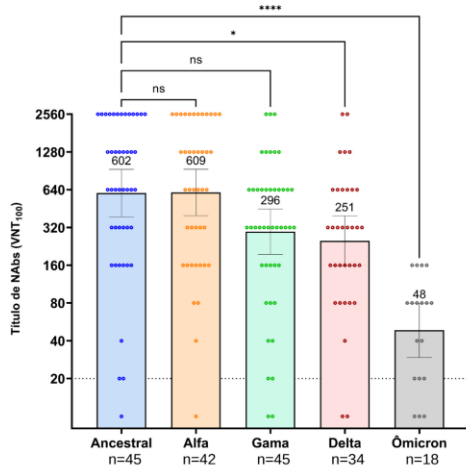


50 dias ou mais

E Sem histórico de Covid-19



F Com histórico de Covid-19



Fonte: Autor

A mesma comparação foi feita com vacinados com duas doses de vacina, porém, neste caso, há quatro agrupamentos de tempo: 10-29 dias, 30-49, 50-69 e maior ou igual a 70 dias, como comentado anteriormente (Figura 36).

Na figura 39 quadro A estão as análises realizadas a partir de amostras de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. A média geométrica permaneceu entre 19 (Ômicron) e 278 (Alfa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a cepa ancestral e a variante a Alfa, mas houve diferença entre Gama, Delta e Ômicron.

No gráfico B, voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, a média geométrica variou entre 45 (Ômicron) e 696 (Alfa). Não houve diferença entre cepa ancestral e variantes, porém o número de amostras testadas para Ômicron é pequeno.

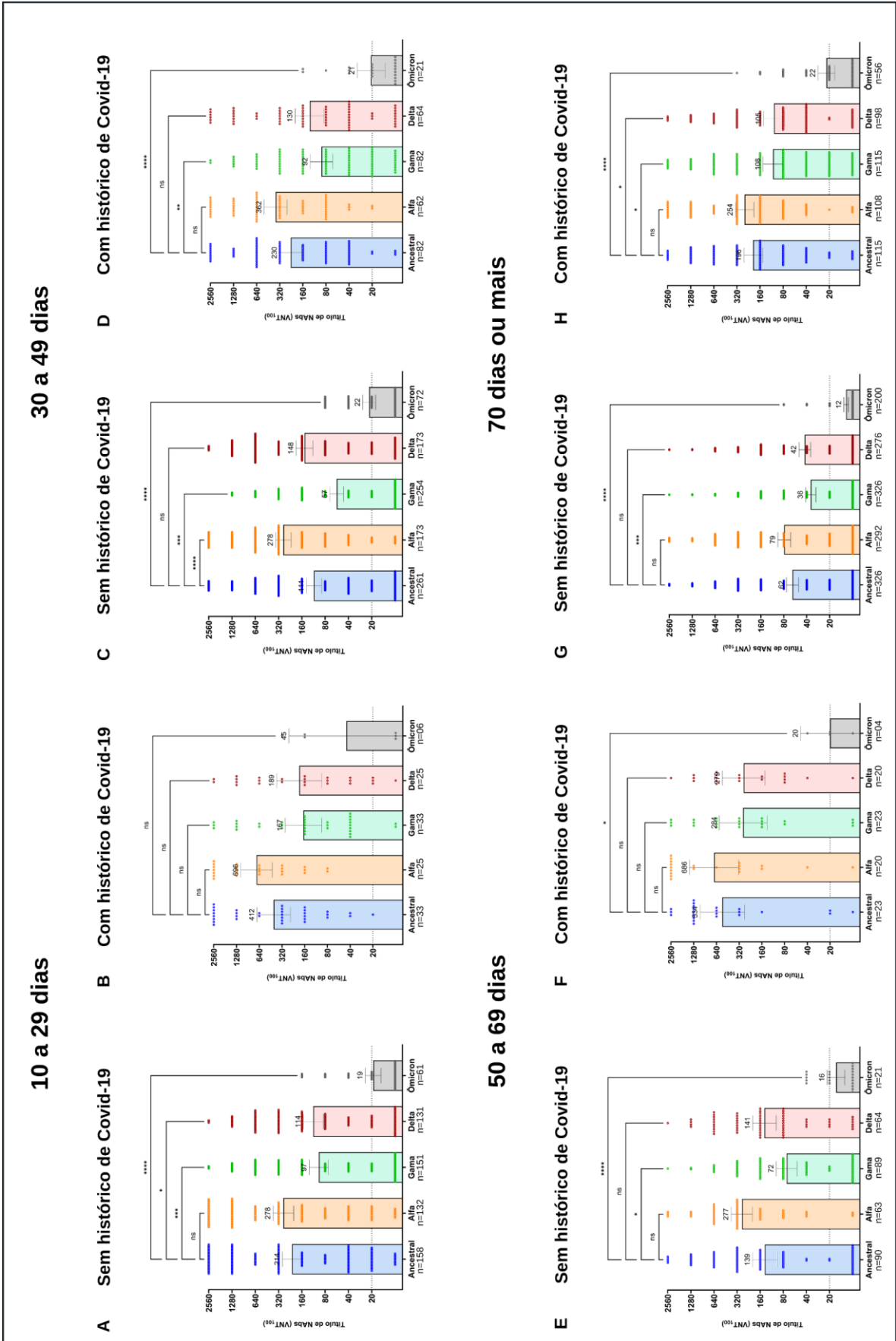
No quadro C, indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes ficou entre 22 (Ômicron) e 278 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre a cepa ancestral e todas variantes testadas, com exceção da variante Delta.

No quadro D, participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, a média geométrica variou entre 21 (Ômicron) e 362 (Alfa) e houve diferença entre a cepa ancestral e as variantes Gama e Ômicron.

No quadro E, voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, a média geométrica ficou entre 16 (Ômicron) e 277 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Gama e Ômicron.

No quadro F, indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, a média geométrica variou entre 20 (Ômicron) e 686 (Alfa). Houve diferença apenas entre cepa ancestral e variante Ômicron, porém o número de amostras testadas para essa variante é pequeno.

Figura 39 – Comparação entre cepa ancestral e variantes do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A e B - Indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em A- sem histórico de Covid-19 e B- com Covid-19 prévio. C e D - Indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em C- sem histórico de Covid-19 e D- com Covid-19 prévio. E e F - Indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em E- sem histórico de Covid-19 e F- com Covid-19 prévio. G e H - Indivíduos com coleta de sangue \geq 70 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em G- sem histórico de Covid-19 e H- com Covid-19 prévio.



Fonte: Autor

No quadro G, participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, a média geométrica ficou entre 12 (Ômicron) e 79 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Gama e Ômicron.

E no quadro H, voluntários com histórico de Covid-19, com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. A média geométrica variou entre 22 (Ômicron) e 254 (Alfa). Houve diferença entre cepa ancestral e todas variantes, com exceção de Alfa.

Também foi feita comparação entre cepa ancestral e variantes com amostras de vacinados com três doses de vacina contra a Covid-19. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue, neste caso, existem quatro grupos distintos. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por participante (Figura 40).

No gráfico A, indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. A média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes, permaneceu entre 68 (Ômicron) e 1631 (Alfa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a cepa ancestral e variantes Alfa e Gama, mas houve diferença entre Delta e Ômicron.

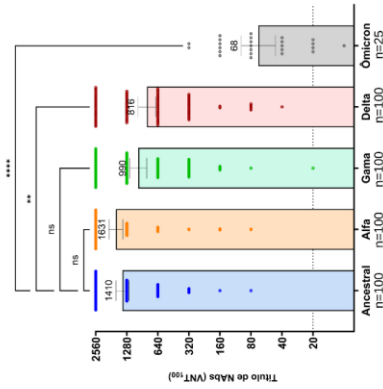
No gráfico B, voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. A média geométrica variou entre 40 (Ômicron) e 1695 (Alfa). E apresentou diferença entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, no entanto o número de amostras testadas para Ômicron é pequeno.

No gráfico C, participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. A média geométrica ficou entre 32 (Ômicron) e 1105 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, no entanto o número de amostras testadas para Ômicron é pequeno.

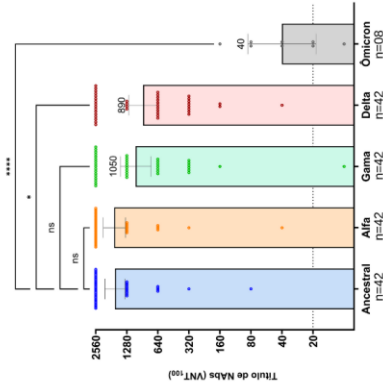
Figura 40 – Comparação entre cepa ancestral e variantes do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com três doses de vacinas contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A e B - Indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em A- sem histórico de Covid-19 e B- com Covid-19 prévio. C e D - Indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em C- sem histórico de Covid-19 e D- com Covid-19 prévio. E e F - Indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em E- sem histórico de Covid-19 e F- com Covid-19 prévio. G e H - Indivíduos com coleta de sangue \geq 70 dias, testados com cepa ancestral, variante Alfa, Gama, Delta e Ômicron e subdivididos em G- sem histórico de Covid-19 e H- com Covid-19 prévio.

10 a 29 dias

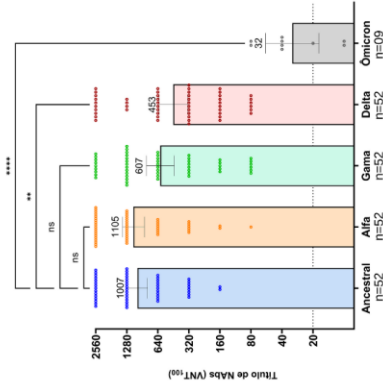
A Sem histórico de Covid-19



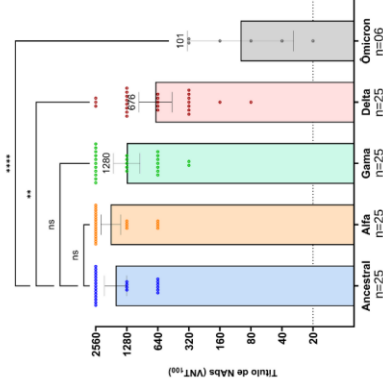
B Com histórico de Covid-19



C Sem histórico de Covid-19

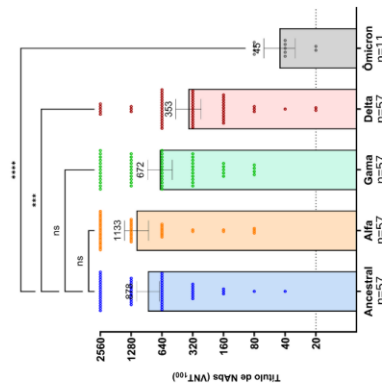


D Com histórico de Covid-19

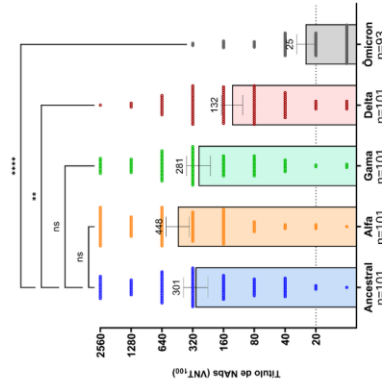


50 a 69 dias

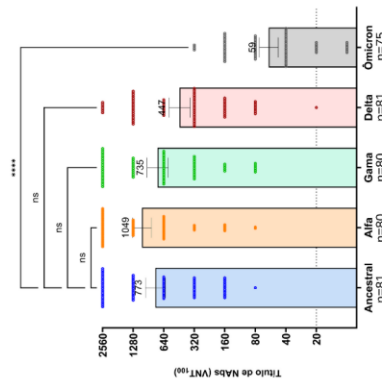
E Sem histórico de Covid-19



F Com histórico de Covid-19



G Sem histórico de Covid-19



H Com histórico de Covid-19

No gráfico D, indivíduos com histórico de Covid-19 e coleta de sangue entre 30 e 49 dias. A média geométrica variou entre 101 (Ômicron) e 1835 (Alfa) e houve diferença entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, nesta análise também havia número pequeno de amostras testadas para Ômicron

No gráfico E, voluntários sem histórico de Covid-19, com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. A média geométrica variou entre 45 (Ômicron) e 1133 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, mas o número de amostras testadas para Ômicron é pequeno.

No gráfico F, participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. A média geométrica dos títulos de anticorpos variou entre 80 (Ômicron) e 1202 (cepa ancestral). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, no entanto o número de amostras testadas para Ômicron foi pequeno.

No gráfico G, indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. A média geométrica ficou entre 25 (Ômicron) e 448 (Alfa). Houve diferença estatisticamente significativa entre cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron.

E no gráfico H, participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. A média geométrica variou entre 59 (Ômicron) e 1049 (Alfa). Houve diferença apenas entre cepa ancestral e variante Ômicron.

Entre as análises, também há comparações entre faixas etárias. Para isso houve a necessidade de classificar as amostras de acordo com a idade dos participantes. Para tomar a decisão de como realizar estas faixas, foi consultada a página da Fundação de Sistema Estadual de Análise de Dados Estatísticos – Seade. Esta fundação está vinculada à Secretaria do Governo e apresenta o boletim sobre a situação da Covid-19 no Brasil.

Quando aborda a distribuição de casos de Covid-19, a Seade apresenta as faixas etárias de dez em dez anos, iniciando com “até 9 anos”, “10-19”, “20-29” e assim por diante. A amostragem presente neste trabalho conta com participantes de 18 até 78 anos. Porém, a quantidade de amostras para cada uma dessas faixas etárias utilizada pela Seade não é suficiente para realizar análises significativas com poder estatístico suficiente para comparação de grupos.

Por isso houve a junção de faixas etárias configurando os grupos da seguinte forma: 18-29 (faixa etária 1), 30-49 (faixa etária 2) e maior ou igual a 50 anos (faixa

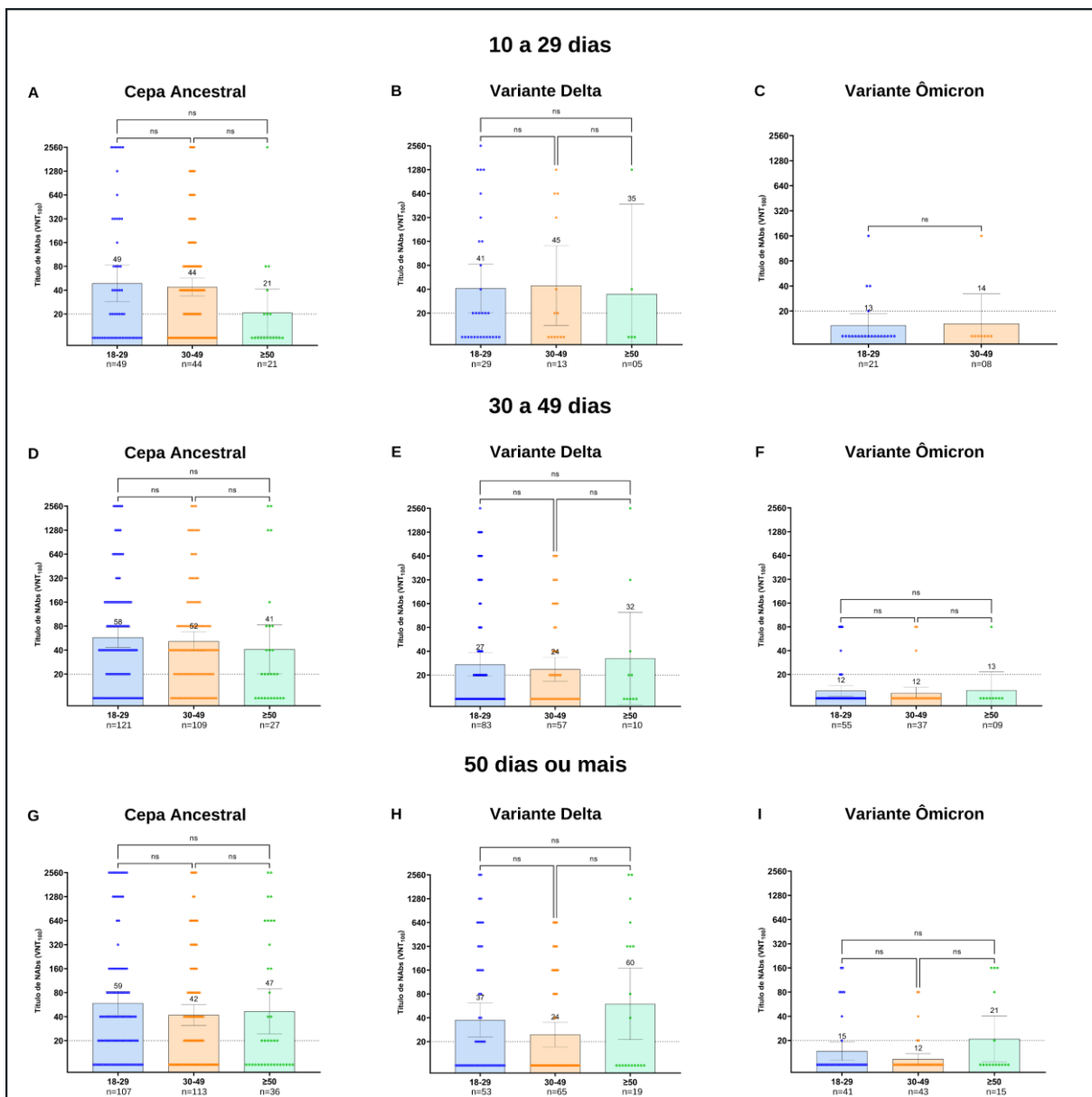
etária 3). E então, utilizando amostras de participantes vacinados com uma, duas e três doses, testados com cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron, foram realizadas comparações entre essas três faixas etárias. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem três agrupamentos de tempo e em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo. Com as amostras de vacinados com uma dose de vacina (Figura 41) não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias, independente da variante testada ou do agrupamento de tempo. Mas é importante sinalizar que em algumas análises, principalmente aquelas referentes às pessoas com 50 anos ou mais, haviam poucas amostras (gráficos B, C, E, F da figura 41).

A mesma comparação foi feita com vacinados com duas doses de vacina de Covid-19. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da segunda dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos. Além disso, cada agrupamento foi dividido em três subgrupos: faixa etária de 18 a 29 anos (1ª faixa etária), 30 a 49 (2ª faixa etária) e maior ou igual a 50 anos (3ª faixa etária). Há apenas uma amostra por indivíduo em cada agrupamento. (Figura 42).

Nos gráficos A e B, houve diferença entre as faixas etárias de 18-29 e 30-49, sendo que os mais jovens produziram títulos mais altos. Nos gráficos C, G, H, I e L, não houve diferenças estatísticas. No gráfico D, foram observadas diferenças entre as três faixas etárias, sendo que quanto mais jovem, maior a média de títulos de anticorpos neutralizantes. No gráfico E, houve diferenças entre as faixas etárias 18-29 e 30-49, também observadas entre 18-29 e maior ou igual a 50 anos. No gráfico F, foi observada diferença entre as faixas etárias 18-29 e maior igual a 50 anos. Porém é importante observar que, neste agrupamento de tempo, a análise realizada com a faixa etária maior ou igual a 50 anos conta com poucas amostras. Nos gráficos J e K, houve diferenças entre as faixas etárias 18-29 e 30-49, também observadas entre 18-29 e maior ou igual a 50 anos.

Figura 41 – Comparação entre faixas etárias, a partir da análise de soros de vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Delta. C- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Ômicron. D- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral. E- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com variante Delta. F- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com variante

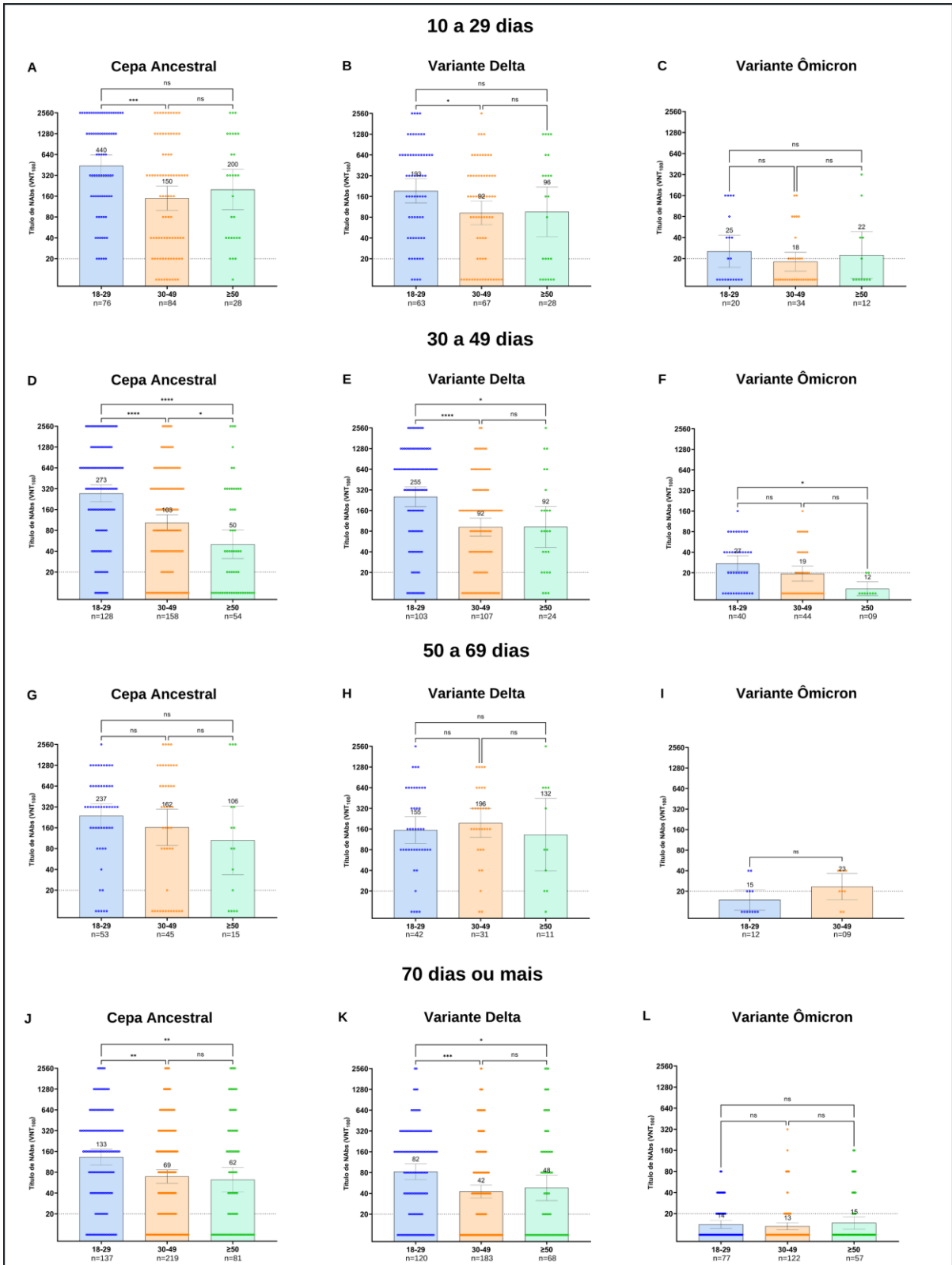
Ômicron. G- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, testados com cepa ancestral. H- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, testados com variante Delta. I- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, testados com variante Ômicron. No eixo x faixas etárias.



Fonte: Autor

Figura 42 – Comparação entre faixas etárias, a partir da análise de soros de vacinados com duas doses de vacinas contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral. B- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Delta. C- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Ômicron. D- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral. E- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com variante Delta. F- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com variante Ômicron. G- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com cepa ancestral. H- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com variante Delta. I- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com variante Ômicron. J- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com cepa ancestral. K- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com variante Delta. L- Soro de

voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com variante Ômicron. No eixo x faixas etárias.



Fonte: Autor

A figura 43 apresenta a mesma comparação, porém com amostras de vacinados com três doses de vacina. As amostras dos participantes foram agrupadas

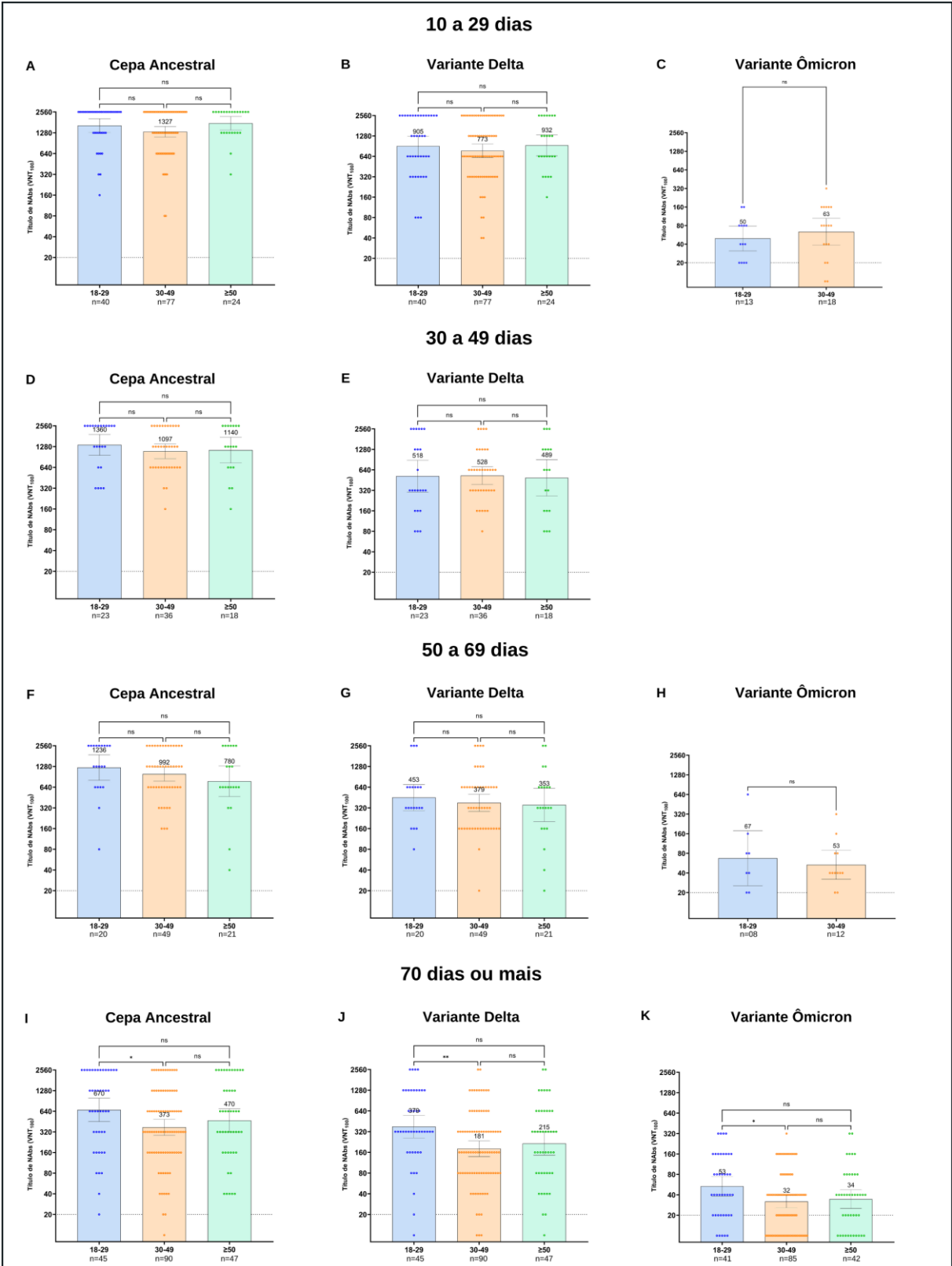
de acordo com o tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos. Além disso, cada agrupamento foi dividido em três subgrupos: faixa etária de 18 a 29 anos (1ª faixa etária), 30 a 49 (2ª faixa etária) e maior ou igual a 50 anos (3ª faixa etária). Há apenas uma amostra por indivíduo em cada agrupamento.

Nas análises representadas pelos gráficos de A até H, não foram observadas diferenças significativas.

Nas análises de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com cepa ancestral, variantes Delta e Ômicron (gráficos I, J e K respectivamente), houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias de 18-29 e 30-49. Em todos os casos os mais jovens apresentaram média de títulos maiores.

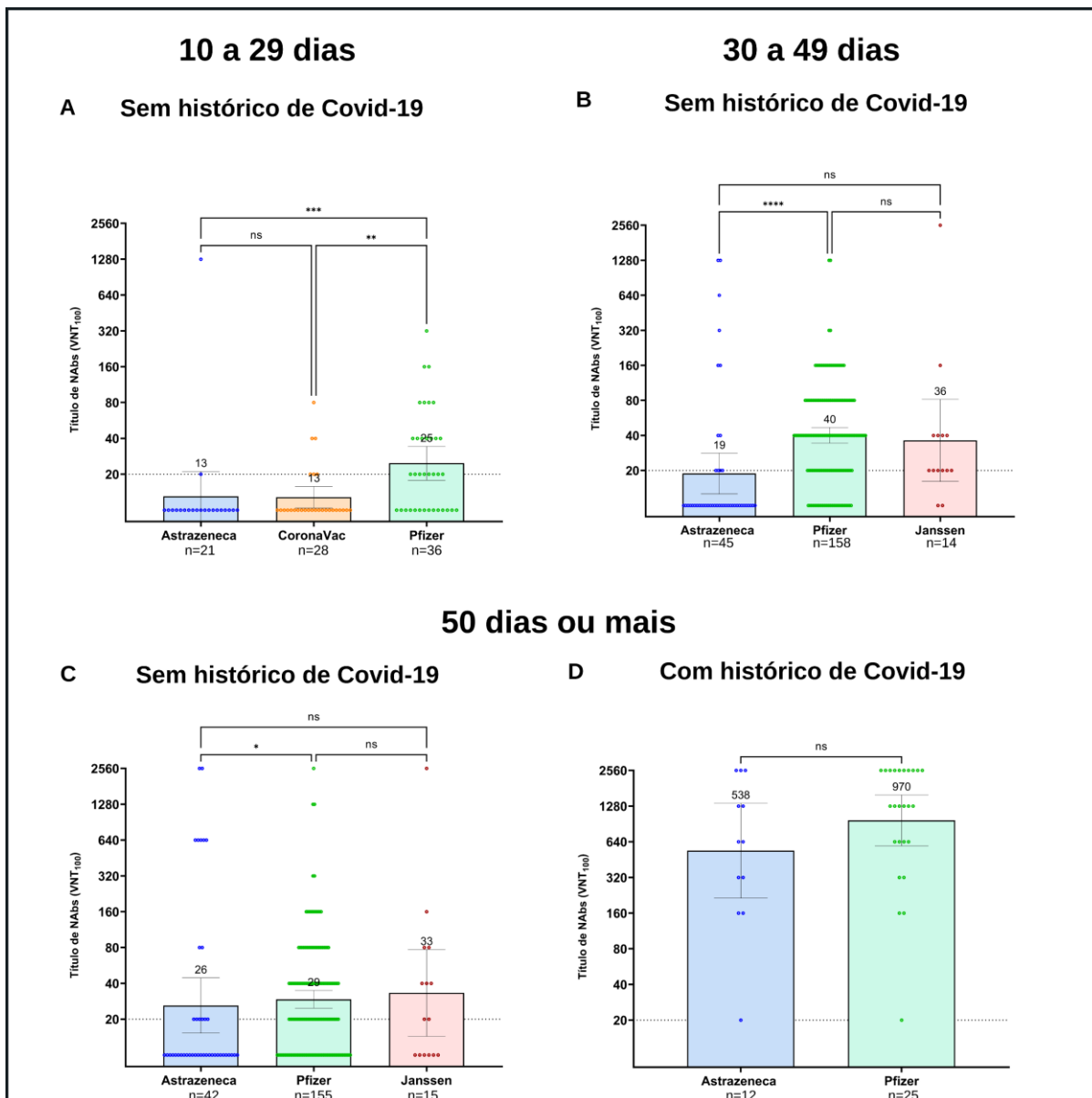
As análises seguintes apresentam a comparação entre vacinas AstraZeneca, CoronaVac, Pfizer e Janssen, testadas com cepa ancestral, com amostras de indivíduos com uma dose de vacina. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com a vacina aplicada (AstraZeneca, CoronaVac, Pfizer ou Janssen) e tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem três agrupamentos de tempo. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo. Nem todos os agrupamentos descritos foram apresentados, pois o número de amostra não foi suficiente. Pelo mesmo motivo, a vacina Janssen não está presente em todas as análises (Figura 44).

Figura 43 – Comparação entre faixas etárias, a partir da análise de soros de vacinados com três doses de vacinas contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com cepa ancestral. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Delta. C- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, testados com variante Ômicron. D- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com cepa ancestral. E- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, testados com variante Delta. F- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com cepa ancestral. G- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com variante Delta. H- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, testados com variante Ômicron. I- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com cepa ancestral. J- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com variante Delta. K- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, testados com variante Ômicron. No eixo x faixas etárias.



Fonte: Autor

Figura 44 – Comparação entre vacinas AstraZeneca, CoronaVac, Pfizer e Janssen, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, testados com cepa ancestral do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. C- Soro de voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, sem histórico da doença. D- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, com histórico da doença.



Fonte: Autor

Para a elaboração do gráfico A, soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. Houve diferença estatisticamente significativa entre CoronaVac e Pfizer e também entre AstraZeneca e Pfizer. Nos dois casos, os participantes com a vacina Pfizer tiveram média de títulos de anticorpos neutralizantes mais altos que os demais. Como os vacinados com CoronaVac receberam a segunda dose de vacina após 30 dias da aplicação da primeira dose, essa vacina só foi abordada neste agrupamento de tempo.

No gráfico B, soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. Só houve diferença entre AstraZeneca e Pfizer, sendo que Pfizer apresentou títulos mais altos.

No gráfico C, soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, sem histórico da doença. A diferença entre AstraZeneca e Pfizer também foi observada, porém com número de P maior.

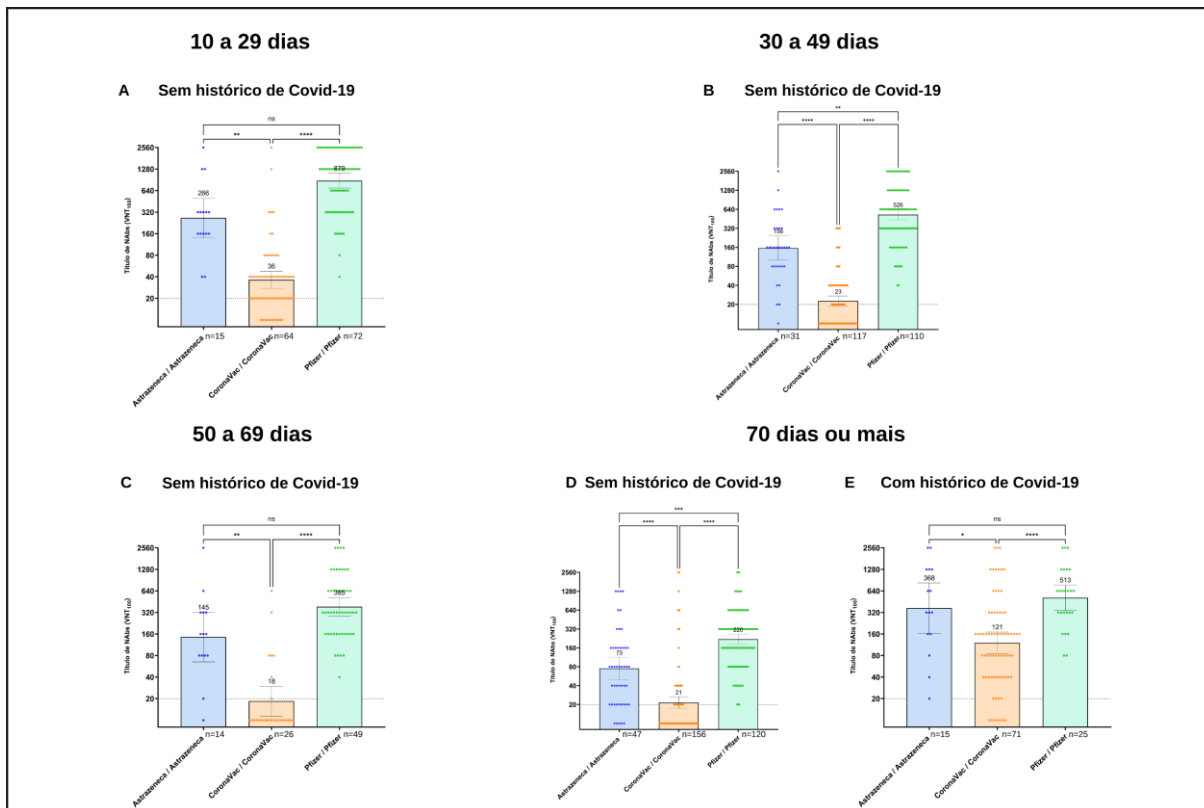
Para a elaboração do gráfico D, soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, com histórico da doença. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as vacinas.

Também foi analisada a diferença entre vacinados com duas doses, testados com a cepa ancestral. Foram analisadas três combinações de vacinas: Az/Az, Cv/Cv e Pf/Pf. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com as combinações de vacinas aplicadas e tempo entre aplicação da segunda dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos de tempo: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias, 50 a 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo (Figura 45).

Para a elaboração do gráfico A, soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. Houve diferença estatisticamente significativa entre Pf/Pf e Cv/Cv e também entre Az/Az e Cv/Cv. No gráfico B, soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. Houveram diferenças estatísticas entre todas as combinações. No gráfico C, soro de voluntários com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, sem histórico da doença. Houve diferença estatisticamente significativa entre Pf/Pf e Cv/Cv e também entre Az/Az e Cv/Cv. Para a elaboração do gráfico D, soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. Houveram diferenças estatísticas entre todas as combinações. No gráfico E, soro de voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença. Neste agrupamento foi possível analisar se há diferença entre essas combinações de vacinas em indivíduos com histórico de Covid-19. Houve diferença estatisticamente significativa entre Pf/Pf e Cv/Cv e também entre Az/Az e Cv/Cv.

Figura 45 – Comparação entre vacinas AstraZeneca, CoronaVac, Pfizer e Janssen, realizada a partir da análise de soro de indivíduos vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19,

testados com cepa ancestral do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. C- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, sem histórico da doença. D- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. E- Soro de voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença.



Fonte: Autor

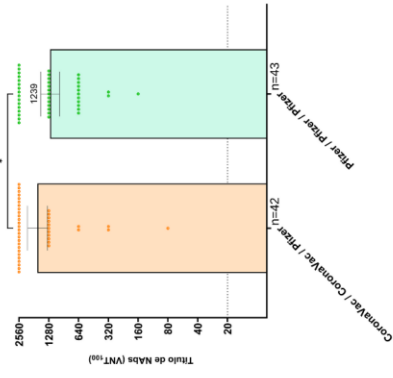
A mesma comparação foi realizada com vacinados com três doses. As combinações de vacinas analisadas foram: CoronaVac/CoronaVac/Pfizer (Cv/Cv/Pf) e Pfizer/Pfizer/Pfizer (Pf/Pf/Pf). A combinação AstraZeneca/AstraZeneca/Pfizer (Az/Az/Pf) só teve número suficiente de amostras para realizar uma das análises (maior ou igual a 70 dias, sem histórico de Covid-19) (Figura 46).

Figura 46 – Comparação entre vacinas AstraZeneca, CoronaVac e Pfizer, realizada a partir da análise de soro de indivíduos vacinados com três doses de vacina contra Covid-19, testados com cepa ancestral do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, com histórico da doença. C- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, sem histórico da doença. D- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, com histórico da doença. E- Soro de voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. F- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença. G- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença.

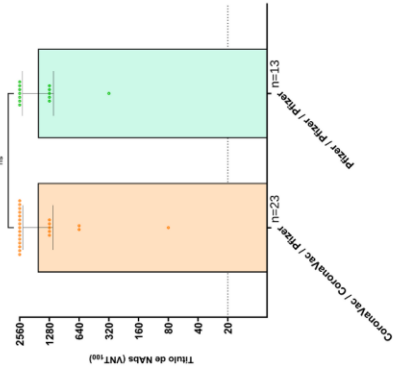
Fonte: Autor

10 a 29 dias

A Sem histórico de Covid-19

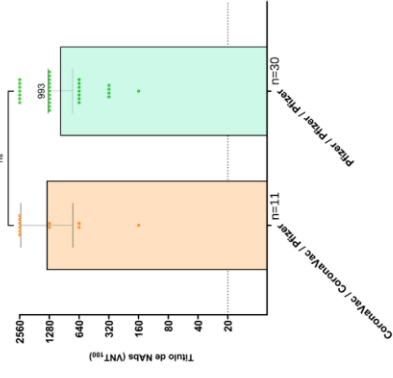


B Com histórico de Covid-19



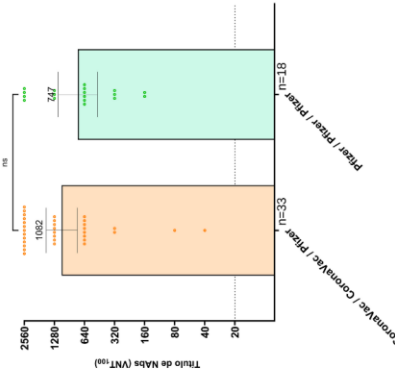
30 a 49 dias

C Sem histórico de Covid-19

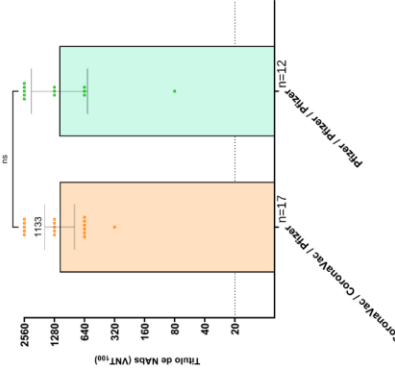


50 a 69 dias

D Sem histórico de Covid-19

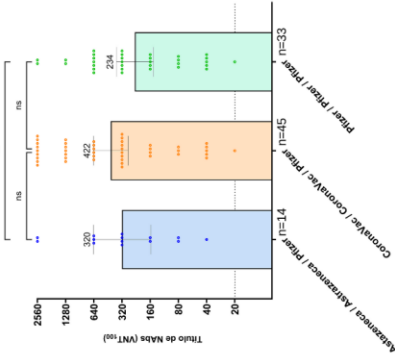


E Com histórico de Covid-19

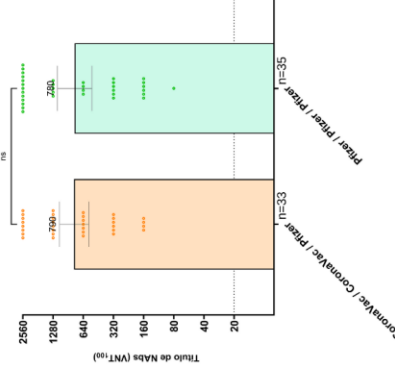


70 dias ou mais

F Sem histórico de Covid-19



G Com histórico de Covid-19



As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com as combinações de vacinas aplicadas e tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos de tempo: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias, 50 a 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Na análise representada pelo gráfico A, participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença, foi identificada diferença estatisticamente significativa entre as combinações de vacinas. Nas demais análises (gráficos B, C, D, E, F e G, não houve diferença estatística entre as combinações de vacinas.

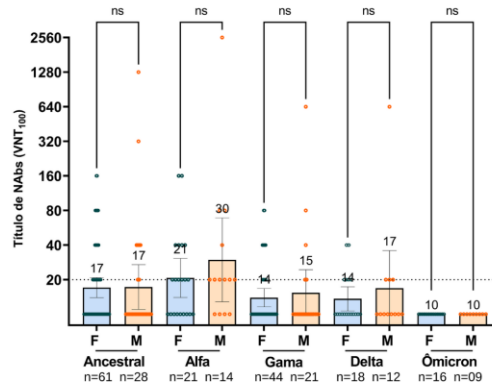
Foi verificado se há diferença nos títulos de anticorpos neutralizantes entre sexo feminino e masculino. A análise foi realizada com integrantes vacinados com uma, duas e três doses de vacinas contra Covid-19. Sempre que possível foram apresentados os dois subgrupos (com e sem histórico da doença) (Figuras 47, 48 e 49).

Na figura 47 estão as análises dos vacinados com uma dose de vacina. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com sexo e tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem três agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias e maior ou igual a 50 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo. Nas análises representadas pelos gráficos da figura 47, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas.

Figura 47 – Comparação entre sexos, realizada a partir da análise de soros de participantes com uma dose de vacina contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. C- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, com histórico da doença. D- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, sem histórico da doença. E- Soro de voluntários com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias, com histórico da doença. No eixo x sexos, cepa e variantes do SARS-CoV-2 utilizadas nos experimentos.

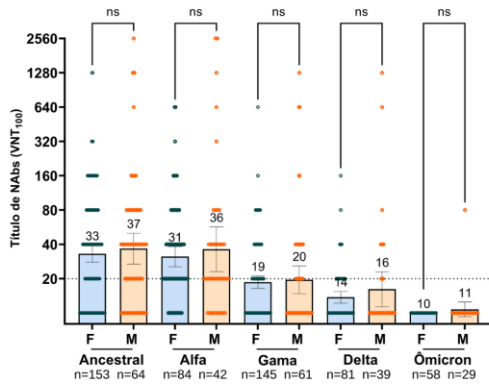
10 a 29 dias

A Sem histórico de Covid-19

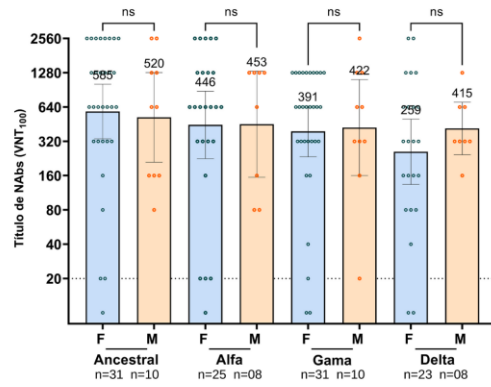


30 a 49 dias

B Sem histórico de Covid-19

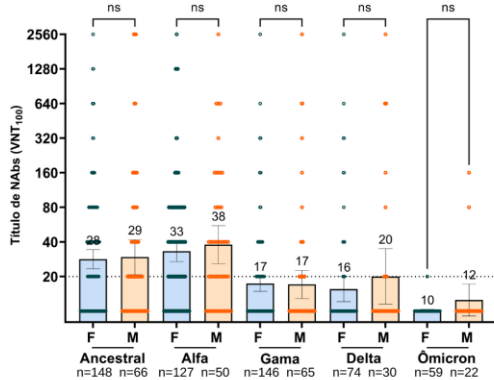


C Com histórico de Covid-19

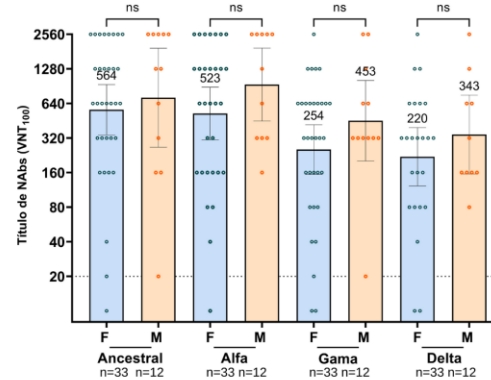


50 dias ou mais

D Sem histórico de Covid-19



E Com histórico de Covid-19



Fonte: Autor

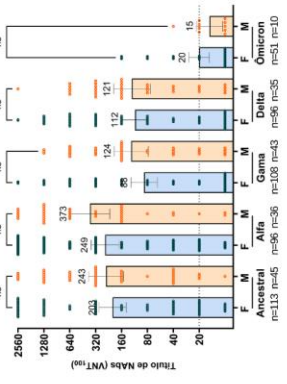
A figura 48 apresenta os resultados dos participantes vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com sexo e tempo entre aplicação da segunda dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias, 50 a 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Nas análises representadas pelos gráficos A, B, D não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas. No gráfico C, indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, com histórico da doença, foi observada diferença estatisticamente significativa entre sexos nas análises com variante Gama. No gráfico E, foram utilizados soros de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. e foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre sexos nas análises realizadas com as variantes Alfa, Gama e Delta. No gráfico F, soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença, foi observada diferença estatisticamente significativa entre sexos nas análises com variante Gama. Em todos os casos onde foram identificadas diferenças, voluntários do sexo masculino apresentaram maior média de título de anticorpos neutralizantes.

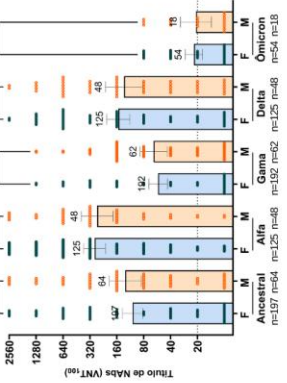
Figura 48 – Comparação entre sexos, realizada a partir da análise de soros de participantes com duas doses de vacina contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. C- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, com histórico da doença. D- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, sem histórico da doença. E- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. F- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença. No eixo x sexos, cepa e variantes do SARS-CoV-2 utilizadas nos experimentos.

10 a 29 dias

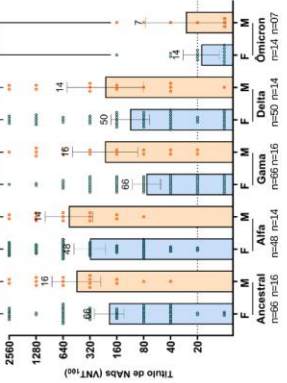
A Sem histórico de Covid-19



B Sem histórico de Covid-19

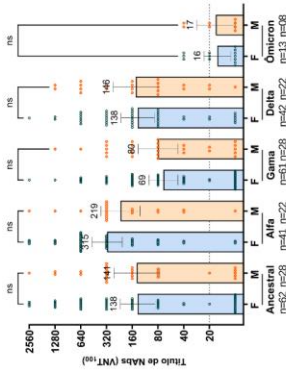


C Com histórico de Covid-19

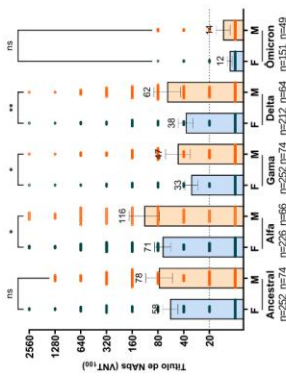


50 a 69 dias

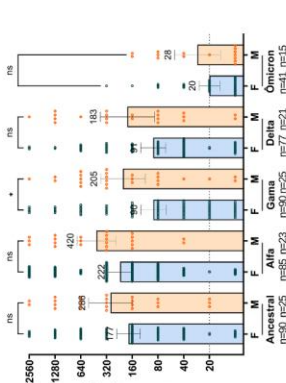
D Sem histórico de Covid-19



E Sem histórico de Covid-19



F Com histórico de Covid-19



A figura 49 apresenta os resultados obtidos a partir das análises de soro de participantes vacinados com três doses de vacinas. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com sexo e tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias, 50 a 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

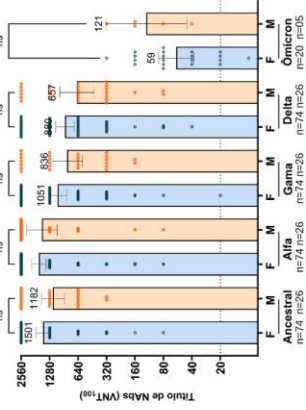
Nas análises representadas pelos gráficos A, B, D, E, F e G não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas. No gráfico C, voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença, houve diferença na análise realizada com a variante Alfa. E neste caso, o grupo do sexo feminino teve maior média de títulos.

Após as análises realizadas, é possível observar que as amostras testadas com cepa ancestral apresentam títulos de anticorpos neutralizantes com níveis mais altos quando comparado com as variantes Delta e Ômicron, por exemplo. Desta forma, as próximas figuras têm o objetivo de verificar a diferença de títulos entre cepa ancestral e variante Delta, assim como entre cepa ancestral e variante Ômicron. Essas diferenças foram verificadas com amostras de participantes vacinados com uma, duas e três doses de vacinas. As figuras 50, 51 e 52 apresentam as análises realizadas entre a cepa ancestral e Delta.

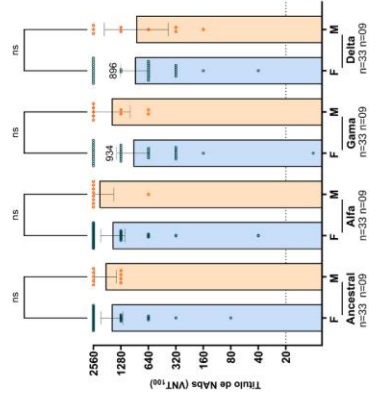
Figura 49 – Comparação entre sexos, realizada a partir da análise de soros de participantes com três doses de vacinas contra Covid-19, testados com cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, sem histórico da doença. B- Soro de participantes com coleta de sangue entre 10 e 29 dias, com histórico da doença. C- Soro de indivíduos com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, sem histórico da doença. D- Soro de voluntários com coleta de sangue entre 30 e 49 dias, com histórico da doença. E- Soro de participantes com coleta de sangue entre 50 e 69 dias, sem histórico da doença. F- Soro de participantes com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, sem histórico da doença. G- Soro de indivíduos com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias, com histórico da doença. No eixo x sexos, cepa e variantes do SARS-CoV-2 utilizadas nos experimentos.

10 a 29 dias

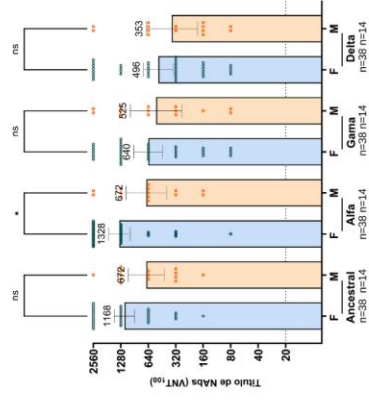
A Sem histórico de Covid-19



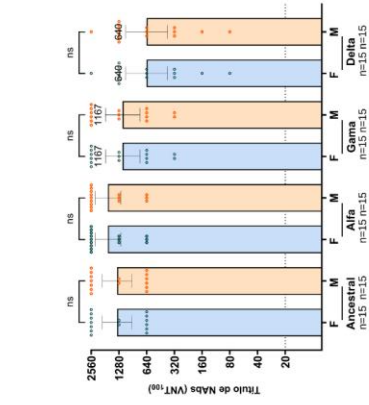
B Com histórico de Covid-19



C Sem histórico de Covid-19



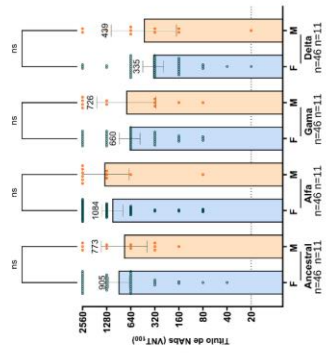
D Com histórico de Covid-19



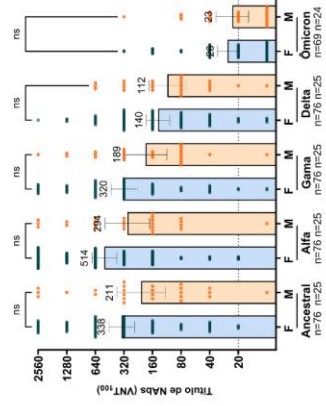
30 a 49 dias

50 a 69 dias

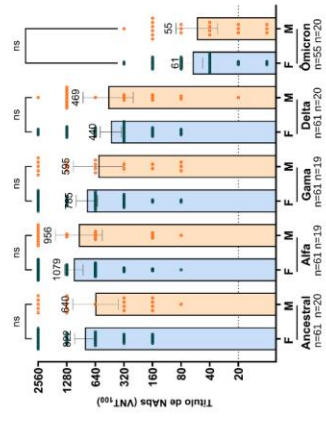
E Sem histórico de Covid-19



F Sem histórico de Covid-19



G Com histórico de Covid-19



70 dias ou mais

A figura 50 expõe os resultados gerados com as análises de soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem três agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias e maior ou igual a 50 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizados soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Foram utilizadas amostras de 30 participantes. O agrupamento apresentou 2,19x de diferença de títulos neutralizantes entre a cepa ancestral e a variante Delta.

No gráfico B, foram utilizadas 17 amostras de soros de indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Foi observada diferença de 3,00x entre as variantes.

Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas 120 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Observada diferença de 3,21x de títulos de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

No gráfico D, foram utilizadas 31 amostras de soros de voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Foi possível observar diferença de 1,82x entre cepa ancestral e Delta.

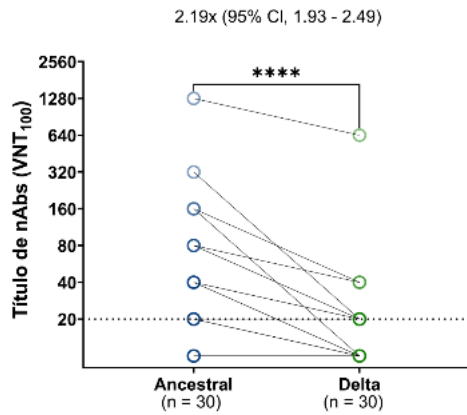
Para a elaboração do gráfico E, foram utilizadas 104 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. Verificada a diferença de 2,41x entre as variantes.

No gráfico F, foram utilizadas 34 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. Observação de diferença de 2,66x entre cepa ancestral e variantes Delta.

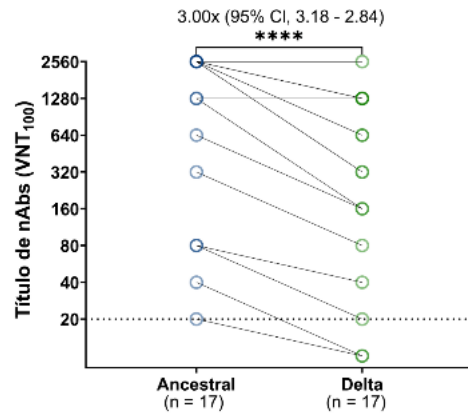
Figura 50 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Delta do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. C- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. D- Indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. E- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. F- participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias.

10 a 29 dias

A Sem histórico de Covid-19

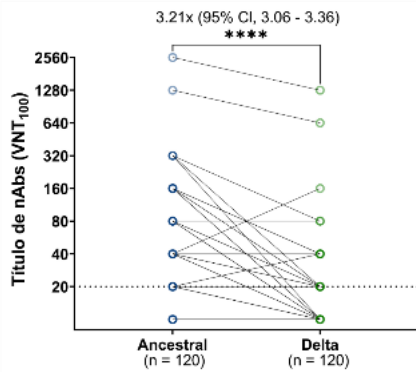


B Com histórico de Covid-19

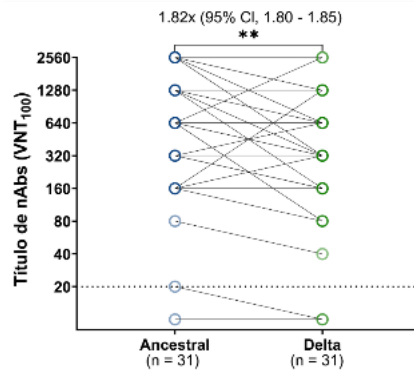


30 a 49 dias

C Sem histórico de Covid-19

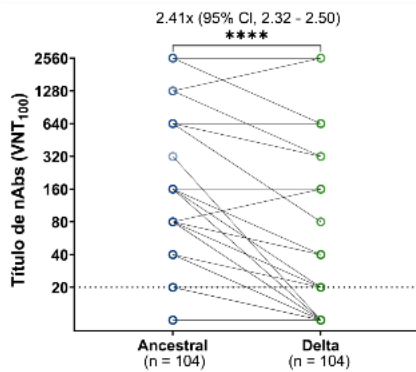


D Com histórico de Covid-19

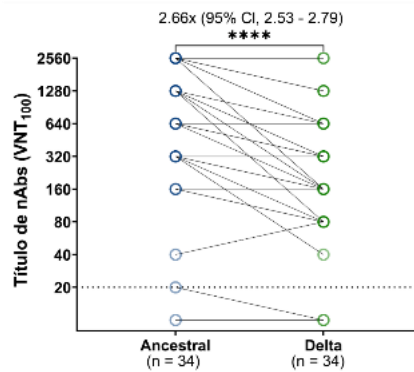


50 dias ou mais

E Sem histórico de Covid-19



F Com histórico de Covid-19



As mesmas análises foram realizadas com amostras de vacinados com duas doses. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da segunda dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após aplicação da segunda dose, 30 a 49 dias, entre 50 e 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo (Figura 51).

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas 131 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Nesta análise a diferença foi de 2,82x no título de anticorpos neutralizantes entre cepa ancestral e variante Delta.

No gráfico B, foram utilizadas 67 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,63x entre as duas variantes.

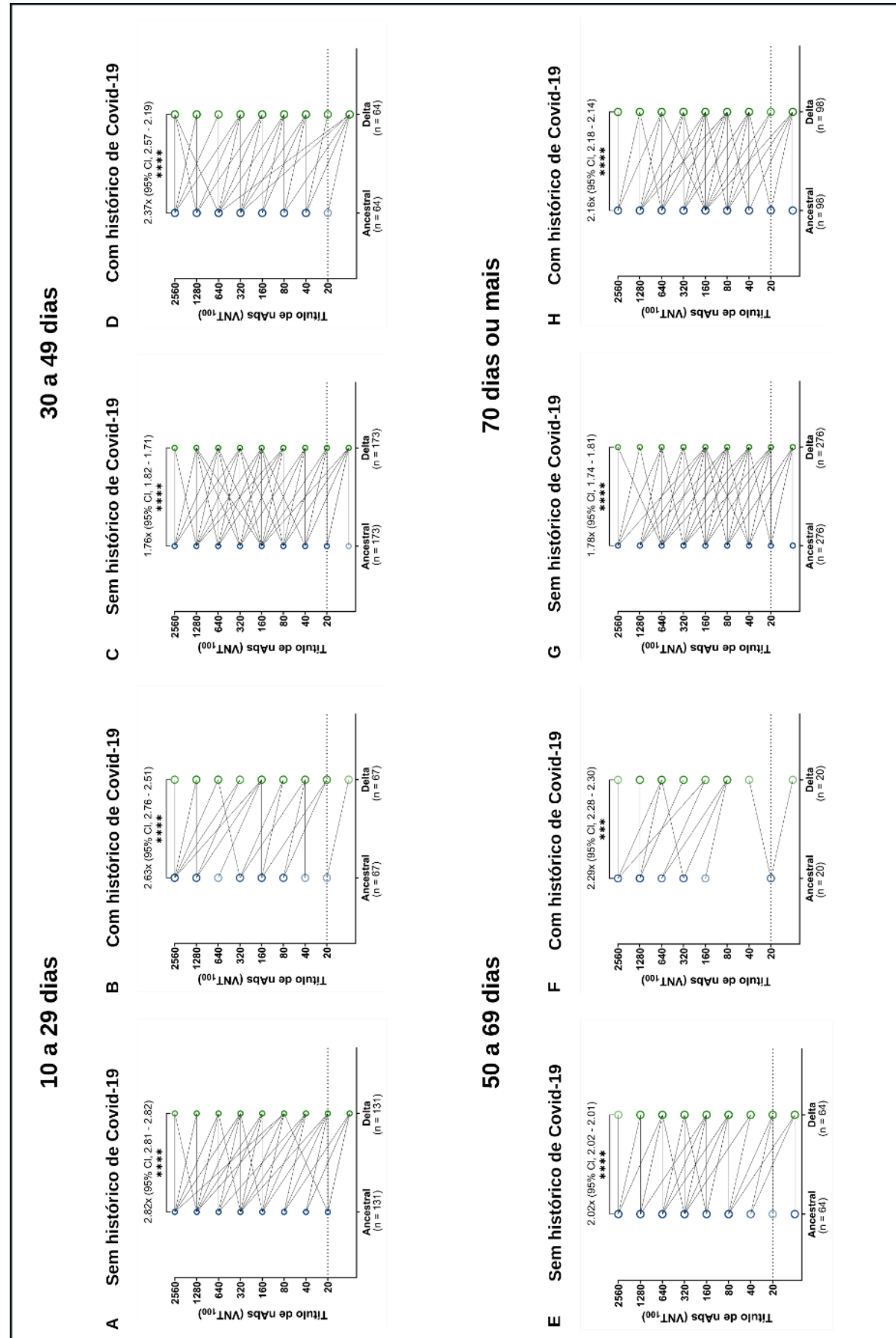
No gráfico C, foram utilizadas 173 amostras de soros de voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Nesta análise a diferença foi de 1,76x entre as variantes.

Para a elaboração do gráfico D, foram utilizadas 64 amostras de soros de indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,37x entre cepa ancestral e variante Delta.

No gráfico E, foram utilizadas 64 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. Nesta análise a diferença foi de 2,02x no título de anticorpos neutralizantes entre as variantes.

No gráfico F, foram utilizadas 20 amostras de soros de voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,29x entre cepa ancestral e variante Delta.

Figura 51 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Delta do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. C- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. D- Indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. E- Voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. F- Indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. G- Voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. H- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias.



Fonte: Autor

Para a elaboração do gráfico G, foram utilizadas 276 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Nesta análise a diferença foi de 1,78x entre as variantes.

No gráfico H, foram utilizadas 98 amostras de soros de indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,16x entre cepa ancestral e variante Delta.

A figura 52 apresenta os resultados das análises de indivíduos vacinados com três doses. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após aplicação da segunda dose, 30 a 49 dias, entre 50 e 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas 100 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Nesta análise a diferença foi de 1,72x do título de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

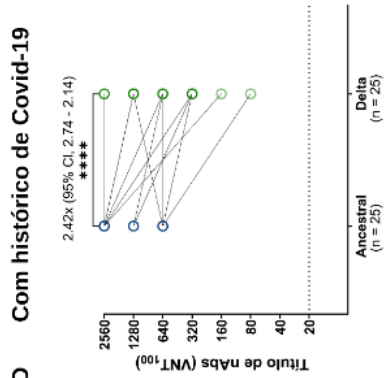
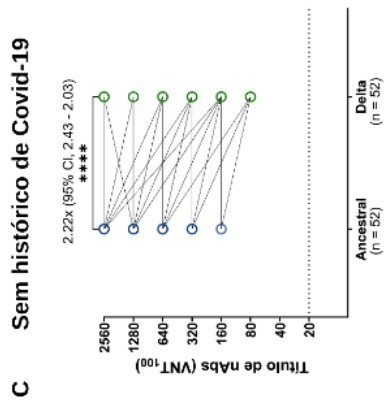
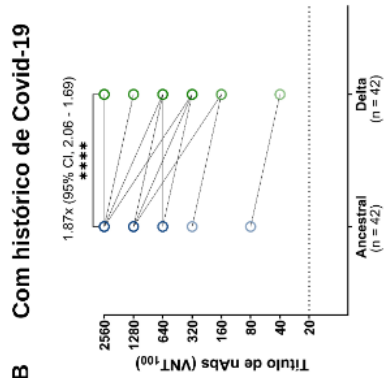
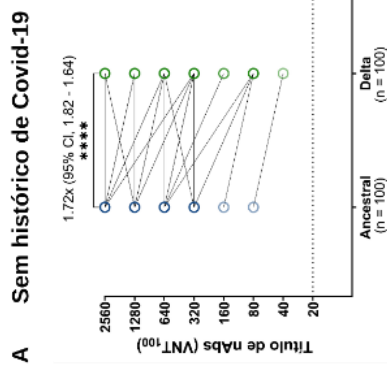
No gráfico B, foram utilizadas 42 amostras de soros de indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 1,87x entre cepa ancestral e variante Delta.

Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas 52 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Nesta análise a diferença foi de 2,22x entre as duas variantes.

No gráfico D, foram utilizadas 25 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,42x do título de anticorpos neutralizantes entre cepa ancestral e variante Delta.

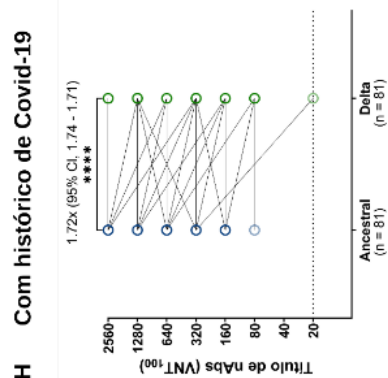
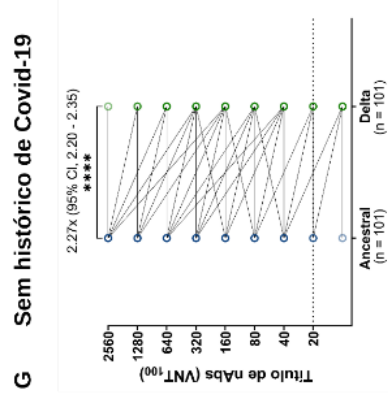
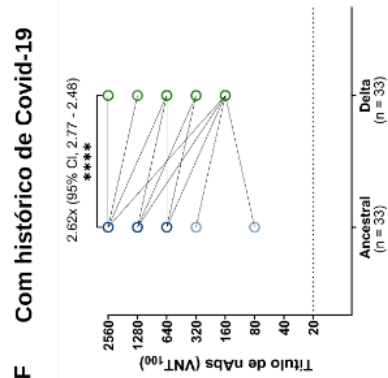
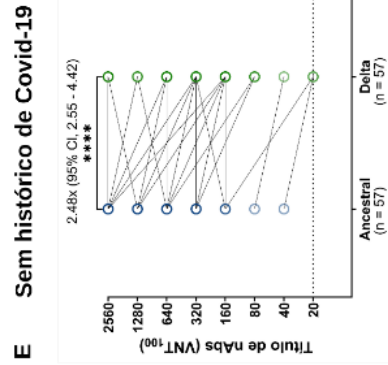
Figura 52 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Delta do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com três doses de vacinas contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. C- Voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. D- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. E- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. F- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. G- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. H- Indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Foram utilizadas amostras de 81 participantes.

10 a 29 dias



30 a 49 dias

50 a 69 dias



70 dias ou mais

Para a elaboração do gráfico E, foram utilizadas 57 amostras de soros de voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. Nesta análise a diferença foi de 2,48x entre cepa ancestral e variante Delta.

No gráfico F, foram utilizadas 33 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,62x entre as duas variantes.

Para a elaboração do gráfico G, foram utilizadas 101 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,27x entre cepa ancestral e variante Delta.

No gráfico H, foram utilizadas 81 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Nesta análise a diferença foi de 1,72x do título de anticorpos neutralizantes entre cepa ancestral e variante Delta.

Também foi feita a comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Ômicron com indivíduos vacinados com uma, duas e três doses de vacinas contra Covid-19. Sempre que possível foram apresentados os agrupamentos e subgrupos descritos anteriormente, de acordo com a disponibilidade de amostras em cada agrupamento ou subgrupo.

As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da primeira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem três agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após a vacinação, 30 a 49 dias e maior ou igual a 50 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo. A figura 53 apresenta os resultados obtidos a partir da análise de soros de vacinados com uma dose da vacina.

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas 25 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Nesta análise a diferença foi de 2,56x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No gráfico B, foram utilizadas 87 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 3,22x do título de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas 14 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Nesta análise a diferença foi de 11,31x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No gráfico D, foram utilizadas 81 amostras de soros de voluntários sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 2,41x entre as duas variantes.

Para a elaboração do gráfico E, foram utilizadas 18 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. Nesta análise a diferença foi de 13,19x do título de anticorpos neutralizantes entre cepa ancestral e variante Ômicron.

Também foi feita a comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Ômicron a partir de soros de indivíduos vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença (Figura 54). As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da segunda dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após aplicação da segunda dose, 30 a 49 dias, entre 50 e 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

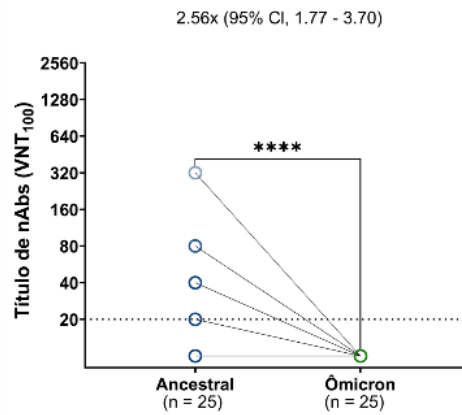
Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas 61 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 6,74x de títulos de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

No gráfico B, foram utilizadas 72 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Nesta análise a diferença foi de 8,15x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

Figura 53 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Ômicron do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com uma dose de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. C- Voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. D- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias. E- Indivíduos com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 50 dias.

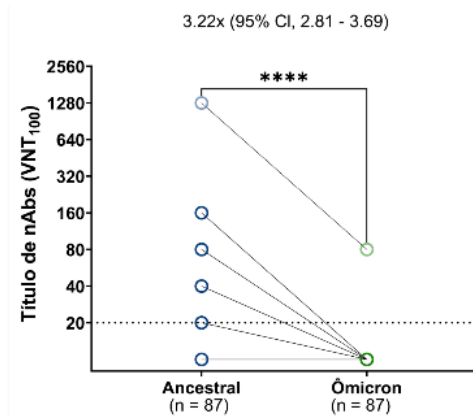
10 a 29 dias

A Sem histórico de Covid-19

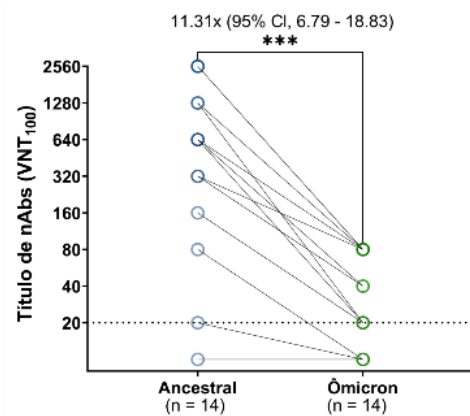


30 a 49 dias

B Sem histórico de Covid-19

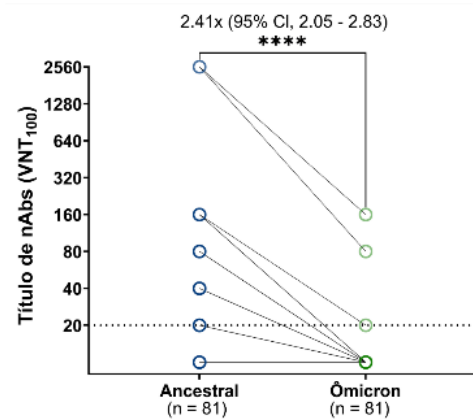


C Com histórico de Covid-19

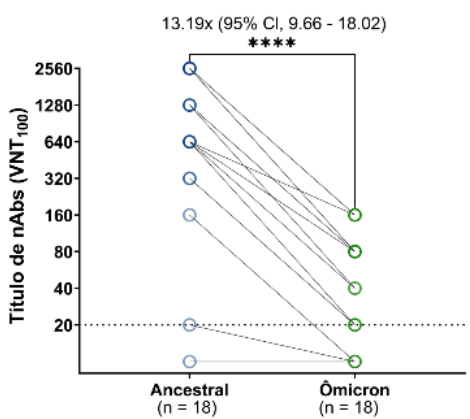


50 dias ou mais

D Sem histórico de Covid-19



E Com histórico de Covid-19



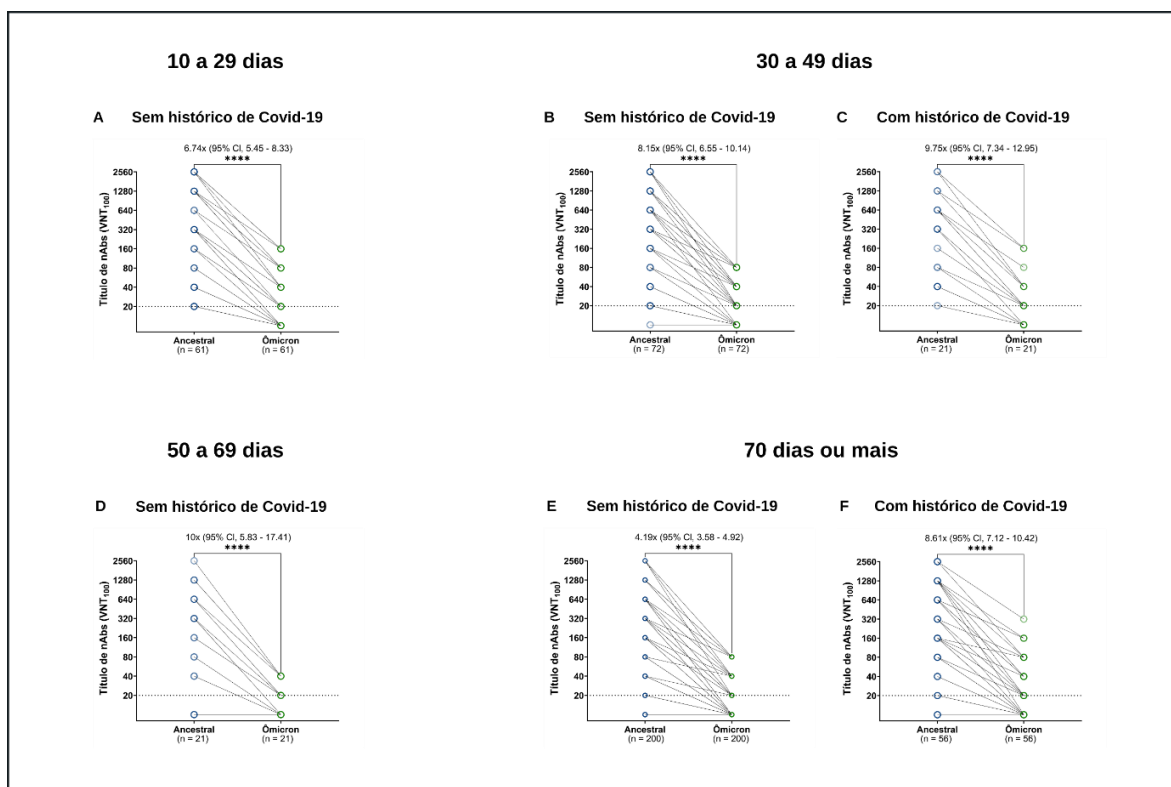
Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas 21 amostras de soros de voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 9,75x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No gráfico D, foram utilizadas 21 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. Nesta análise a diferença foi de 10x de títulos de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

Para a elaboração do gráfico E, foram utilizadas 200 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 14,19x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

No gráfico F, foram utilizadas 56 amostras de soros de voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Nesta análise a diferença foi de 8,61x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

Figura 54 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Ômicron do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com duas doses de vacina contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. C- Voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 30 e 49 dias. D- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 50 e 69 dias. E- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. F- Participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias.



Fonte: Autor

A figura 55 apresenta o resultado dos vacinados com três doses da vacina contra a Covid-19. As amostras dos participantes foram agrupadas de acordo com o tempo entre aplicação da terceira dose e coleta de sangue. Neste caso, existem quatro agrupamentos: coletas realizadas entre 10 e 29 dias após aplicação da segunda dose, 30 a 49 dias, entre 50 e 69 dias e maior ou igual a 70 dias. Além disso, cada agrupamento foi dividido em dois subgrupos: com histórico de Covid-19 e sem histórico da doença. Em cada grupo há apenas uma amostra por indivíduo.

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas 25 amostras de soros de participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. Neste agrupamento foi observada diferença de 18,37x do título de anticorpos neutralizantes entre as duas variantes.

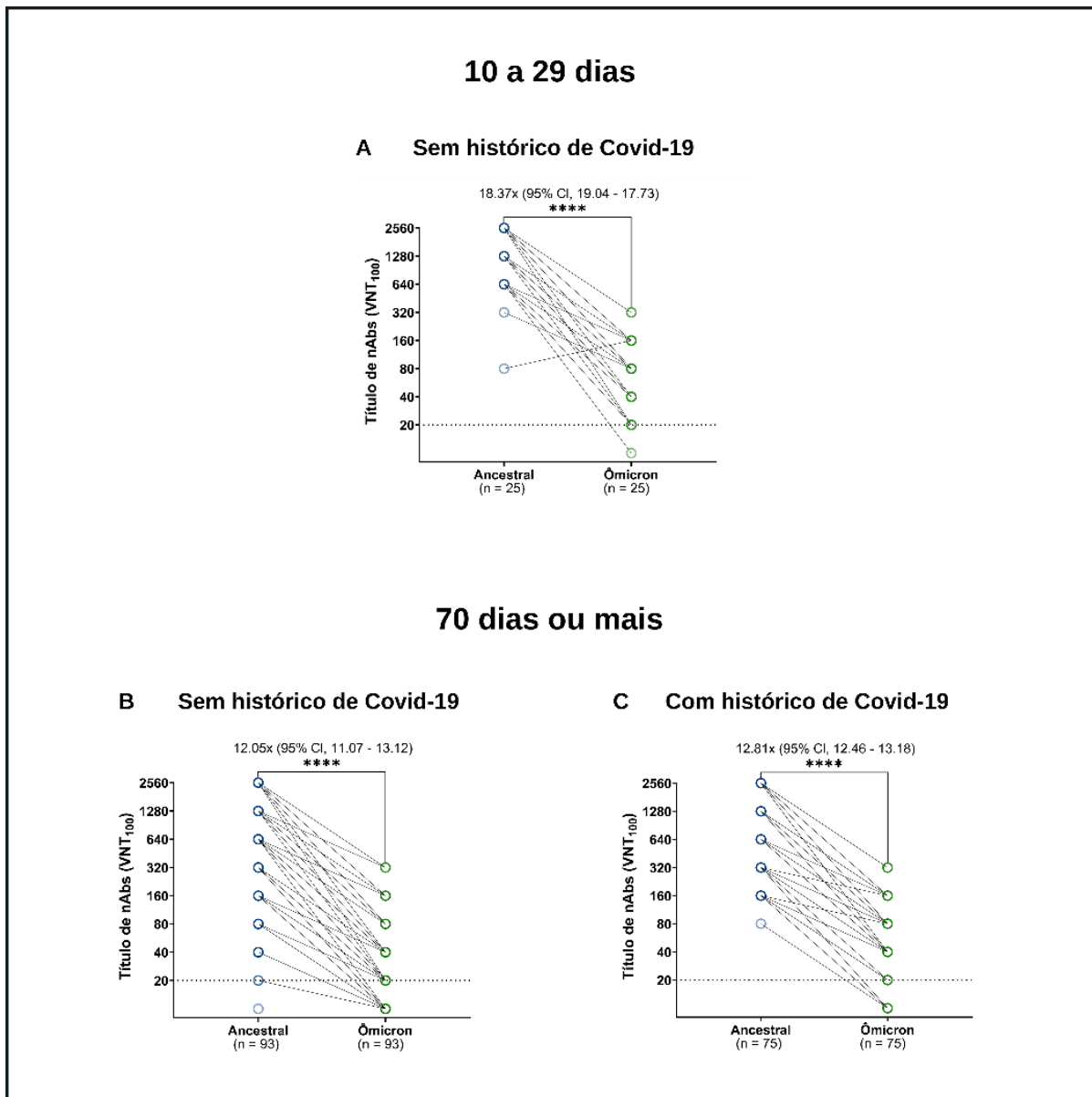
No gráfico B, foram utilizadas 93 amostras de soros de indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Nesta análise a diferença foi de 12,05x entre cepa ancestral e variante Ômicron.

Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas 75 amostras de soros de participantes com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. Nesta análise a diferença foi de 12,81x entre cepa ancestral e variante Ômicron. Os demais agrupamentos e subgrupos não foram apresentados por falta de amostragem significativa.

Por último, foram realizadas análises para verificar correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo (dias) após primeira vacinação. Três análises de correlação foram feitas: 1- utilizando todas as amostras que foram testadas com cepa ancestral; 2- utilizando todas as amostras que foram testadas com variante Ômicron; 3- todas as amostras que foram testadas simultaneamente com cepa ancestral e variante Ômicron (pareadas).

Para essas análises existem dois agrupamentos: Participantes que receberam primeira e segunda doses Cv/Cv e os que foram vacinados com Az/Az ou Pf/Pf. As vacinas CoronaVac e AstraZeneca/Pfizer estão apresentadas em agrupamentos distintos, pois entre elas existe diferença de tempo na espera da aplicação da segunda dose. Já a terceira dose é igual para todos os grupos: aplicação de AstraZeneca, Pfizer ou Janssen. As estrelas vermelhas apontam o momento aproximado da aplicação da primeira, segunda e terceira doses respectivamente. Nesses agrupamentos ainda existem dois subgrupos: participantes sem histórico de Covid-19 e indivíduos com histórico da doença.

Figura 55 – Comparação de títulos entre cepa ancestral e variante Ômicron do SARS-CoV-2 a partir da técnica CPE-VNT, realizada com soros de indivíduos vacinados com três doses de vacinas contra Covid-19, com e sem histórico da doença. A- Indivíduos sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue entre 10 e 29 dias. B- Participantes sem histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias. C- Voluntários com histórico de Covid-19 com coleta de sangue maior ou igual a 70 dias.



Fonte: Autor

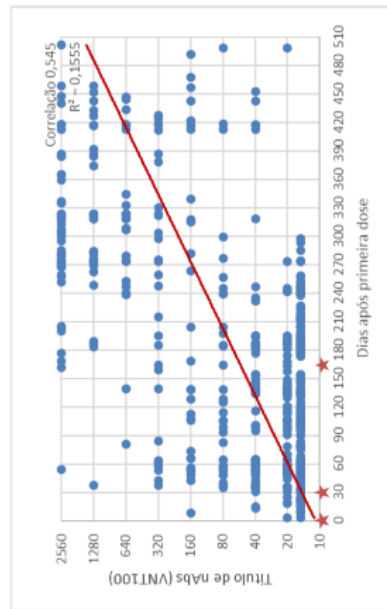
Na figura 56 estão todas as amostras do estudo testadas com cepa Ancestral e que se encaixam nas características de vacinação aqui descritas.

Figura 56 – Linha do tempo desde a aplicação da primeira dose de vacina contra Covid-19, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma, duas e três doses, testados com cepa ancestral do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. B- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. C- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. D- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose.

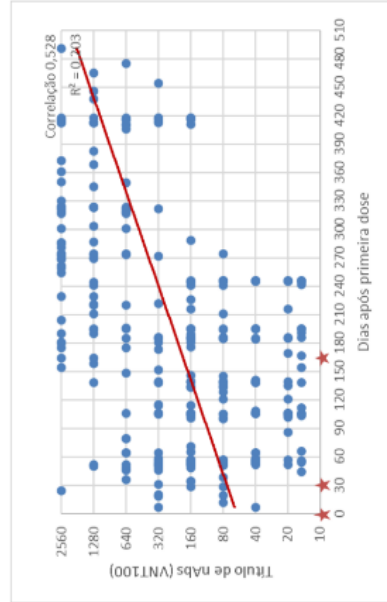
Cepa Ancestral

1ª e 2ª doses: CoronaVac/CoronaVac 3ª dose: Astrazeneca, Pfizer ou Janssen

A Sem histórico de Covid-19

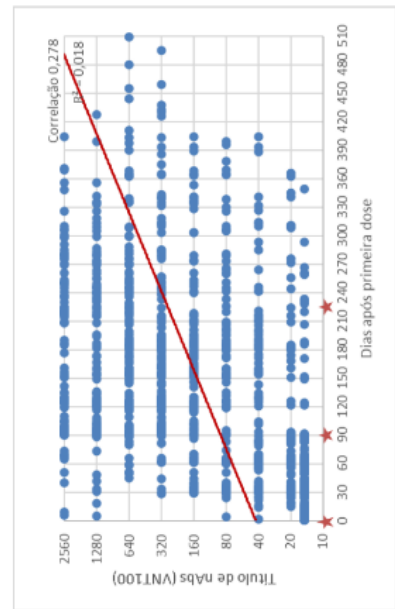


B Com histórico de Covid-19

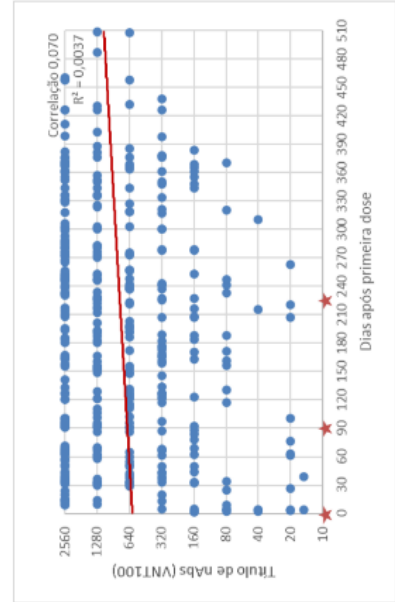


1ª e 2ª doses: Astrazeneca/Astrazeneca ou Pfizer/Pfizer 3ª dose: Astrazeneca, Pfizer ou Janssen

C Sem histórico de Covid-19



D Com histórico de Covid-19



Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 770 amostras de 212 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,545 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo (em dias).

No gráfico B, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 345 amostras de 110 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,528 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo.

Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 1552 amostras de 293 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,278 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo.

No gráfico D, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 420 amostras de 115 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,070 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo.

Na figura 57 estão todas as amostras do estudo testadas com Variante Ômicron e que se encaixam nas características de vacinação descritas.

Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 295 amostras de 145 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,359 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo (em dias).

No gráfico B, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 96 amostras de 61 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,349 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo.

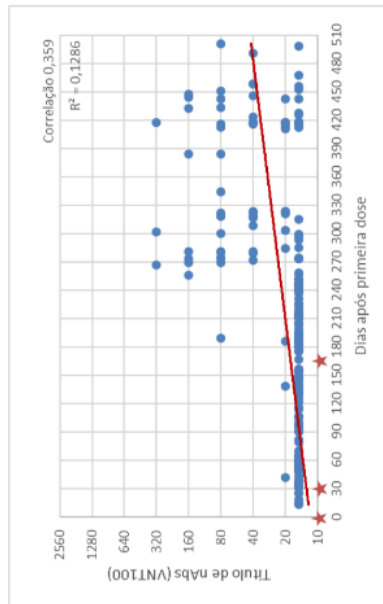
Figura 57 – Linha do tempo desde a aplicação da primeira dose de vacina contra Covid-19, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma, duas e três doses, testados com variante Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. A- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. B- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. C- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 498 amostras de 217 participantes sem histórico de Covid-19. D- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose.

Variante Ômicron

1ª e 2ª doses: CoronaVac/CoronaVac 3ª dose: Astrazeneca, Pfizer ou Janssen

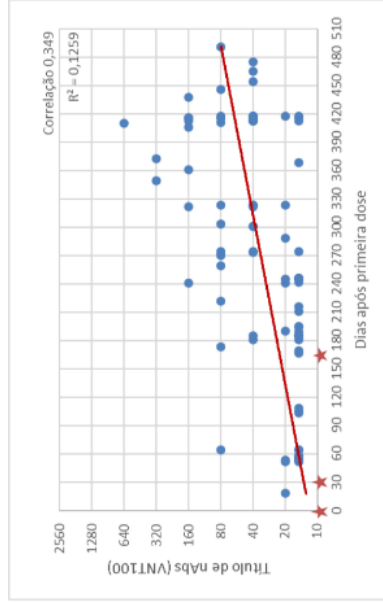
A

Sem histórico de Covid-19



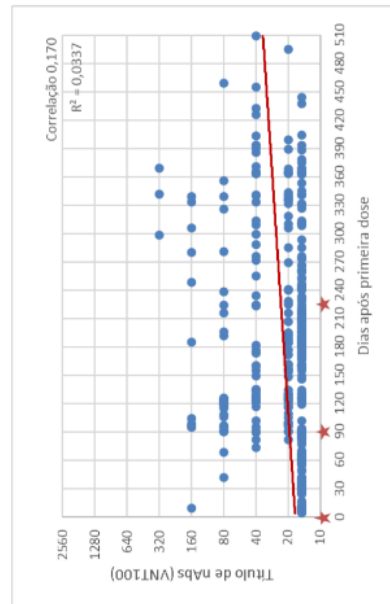
B

Com histórico de Covid-19



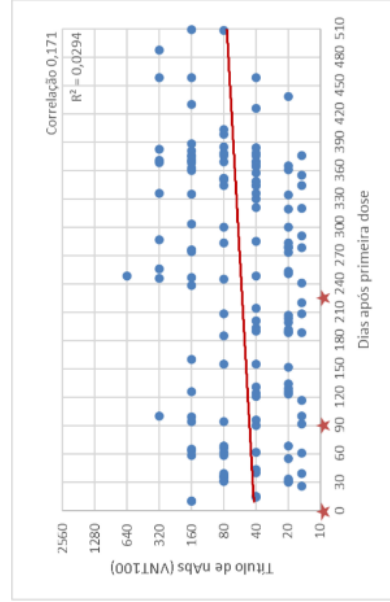
C

Sem histórico de Covid-19



D

Com histórico de Covid-19



Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 498 amostras de 217 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,170 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo. No gráfico D, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 146 amostras de 85 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada correlação de 0,171 entre título de anticorpos neutralizantes e tempo.

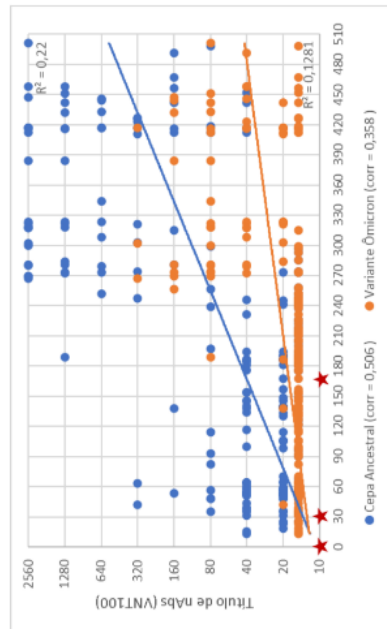
Na figura 58 é possível visualizar a cepa ancestral e a variante Ômicron no mesmo gráfico, para melhor comparação visual. Todas as amostras que foram testadas com cepa ancestral (azul) também foram testadas com variante Ômicron (laranja). Para a elaboração do gráfico A, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 295 amostras de 145 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada que a correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo da cepa ancestral foi de 0,506 e variante Ômicron 0,358. No gráfico B, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Cv/Cv na primeira e segunda dose. Foram analisadas 96 amostras de 61 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada que a correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo da cepa ancestral foi de 0,472 e para Ômicron 0,364. Para a elaboração do gráfico C, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 498 amostras de 217 participantes sem histórico de Covid-19. Foi observada que a correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo da cepa ancestral foi de 0,197 e da Ômicron 0,188. No gráfico D, foram utilizadas amostras de participantes com combinação de vacinas Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. Foram analisadas 146 amostras de 85 participantes com histórico de Covid-19. Foi observada que a correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo da cepa ancestral foi de -0,025 e de 0,172 para Ômicron.

Figura 58 – Linha do tempo desde a aplicação da primeira dose de vacina contra Covid-19, realizada a partir da análise de soros de indivíduos vacinados com uma, duas e três doses, testados com cepa ancestral e variante Ômicron do SARS-CoV-2 pela técnica CPE-VNT. Todas as amostras que foram testadas com cepa ancestral (azul) também foram testadas com variante Ômicron (laranja). A- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. B- Combinação de Cv/Cv na primeira e segunda dose. C- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose. D- Combinação de Az/Az ou Pf/Pf aplicadas na primeira e segunda dose.

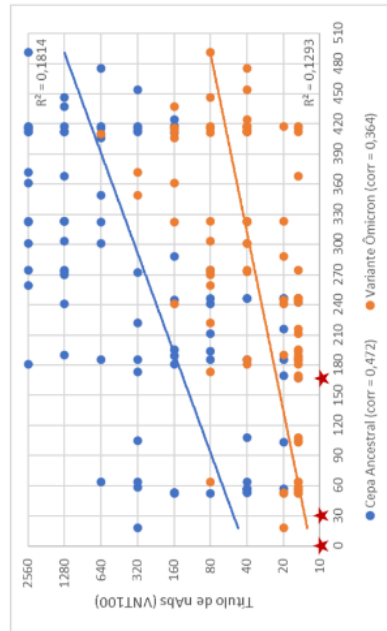
Cepa Ancestral e Variante Ômicron

1ª e 2ª doses: CoronaVac/CoronaVac 3ª dose: Astrazeneca, Pfizer ou Janssen

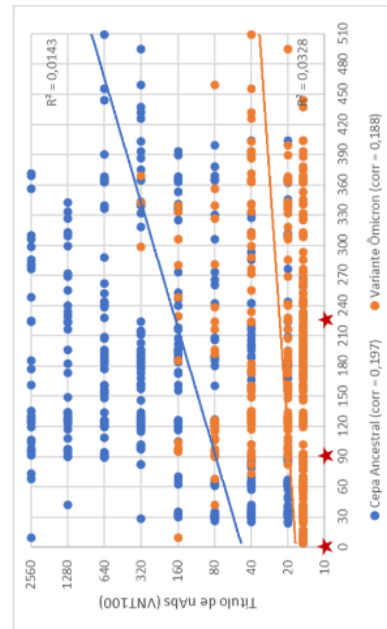
A Sem histórico de Covid-19



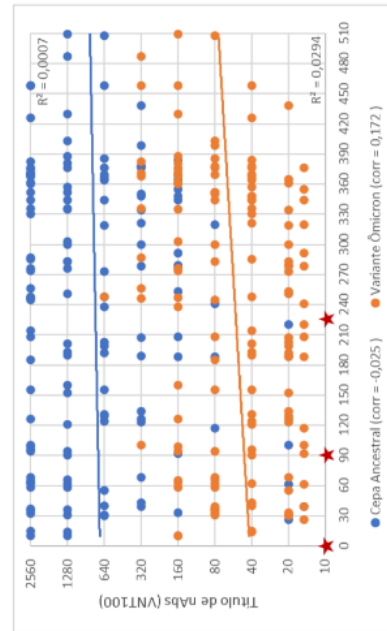
B Com histórico de Covid-19



C Sem histórico de Covid-19



D Com histórico de Covid-19



6. DISCUSSÃO

No início da pandemia as orientações pelo *European and American Center for Disease Prevention and Control* (ECDPC and ACDC) (EUROPEAN CDC, 2020b), seguidas no Brasil, exigiam dois testes negativos de qRT-PCR a partir de amostras respiratórias obtidas com 24 horas de intervalo, tomados pelo menos 10 dias após o início dos sintomas. Como não havia provas consistentes de que a detecção do ácido nucleico viral do SARS-CoV-2 através de RT-qPCR equivalia automaticamente a infecciosidade, estes períodos de ausência pareciam ser mais longos do que o necessário. No entanto, em 2020, a disseminação prolongada de RNA do SARS-CoV-2 com uma duração mediana de 53 dias e um máximo de 83 dias, foi notificada em 36 doentes por Li et al. (LI; WANG; LV, 2020). Num outro estudo, foi observada uma duração mediana de excreção viral de 20 dias com um máximo de 37 dias (ZHOU et al., 2020).

Neste trabalho, foi avaliado o período de excreção de vírus viável por pacientes com Covid-19 e também o processo de congelamento e descongelamento destas amostras. Nossos resultados sugerem que tanto amostras congeladas quanto as que foram mantidas em geladeira não tiveram prejuízos suficiente para interferir no resultado final do experimento, uma vez que foi possível isolarmos 71% (430/605) das primeiras coletas. Portanto, nossos resultados mostraram que a temperatura da geladeira é suficiente para manter o vírus viável até dois dias, assim como o congelamento da amostra em temperatura baixíssima (-80°C), corroborando, em parte, com as informações do Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde – CIEVS que recomenda que as amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe sejam armazenadas a -70°C ou -20°C por até 48 horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). Entretanto, não avaliamos o congelamento do vírus em freezer -20°C.

Amostras classificadas como “re-coletas” indetectáveis pela técnica de qPCR, apresentaram crescimento viral ou ECP quando inoculadas em cultura celular, já na primeira passagem da amostra clínica (T0). A partir dessa primeira inoculação (T0), foram feitas pelo menos mais duas “passagens” consecutivas da T0 originando as passagens T1 e T2. As passagens consecutivas, tem como objetivo detectar ECP em células e confirmar a replicação do vírus na célula, através da diminuição de Ct em relação ao Ct da amostra clínica por qPCR. Após as 3 passagens consecutivas e sem

ECP e diminuição da carga viral original, a amostra foi classificada como não infecciosa ou livre de vírus. Nosso resultado sugere que mesmo uma pequena quantidade de partículas virais, sendo a técnica de qPCR incapaz de detectar, pode infectar culturas de células e podemos extrapolar que pelo menos 5% das pessoas com cargas virais baixas/indetectáveis que voltaram ao trabalho nesta pandemia, puderam ser capazes de transmitir o vírus a outras pessoas.

Na literatura existem poucos trabalhos que apresentaram tentativas de isolamento de amostras de participantes que já apresentavam teste de qPCR negativos. Contudo, Cao et al (CAO et al., 2020), fornece um alerta para os resultados negativos de *swabs* nasofaríngeos de suspeita de infecção por SARS-CoV-2. No estudo em questão, foram identificados indivíduos com resultados negativos que foram capazes de transmitir a doença para outras pessoas. Entretanto, discordando de nosso estudo, Laferyl e colaboradores, obtiveram resultados diferentes do nosso. Eles estudaram 40 profissionais de saúde na fase convalescente de Covid-19 (entre 7-58 dias pois início da doença) saudáveis, que não estavam trabalhando devido aos resultados positivos constantes de RT-qPCR em *swabs* combinados de nasofaríngeos (NP) e orofaríngeos (OP) após a infecção por SRA-CoV-2. Eles concluíram que valores do limiar final de detecção do *Ct* em RT-qPCR [média 37,4; mediana 37,3; intervalo 30,8-41,7] com a falta de crescimento do vírus na cultura celular indicam que apesar dos resultados positivos da qPCR, os PSI não excretam vírus infeccioso e consequentemente são incapazes de disseminação da doença, sobretudo se o indivíduo já tiver produzido NABs (LAFERL et al., 2021).

Quando as nossas amostras foram analisadas tomando como referência, foi demonstrado que há uma relação entre valor do *Ct* da amostra clínica e chances de isolamento. Outros estudos conduzidos principalmente em 2020 foram realizados e não lograram isolar vírus de amostras com *Ct* > 34 (JONES et al., 2020; LA SCOLA et al., 2020). Isto pode ser explicado pelo fato que nesta pandemia, muitos profissionais e pesquisadores sem ou com pouca experiência com vírus respiratórios precisaram trabalhar, pela necessidade do momento, numa área que não era a sua. Desta forma, muitas técnicas e laudos acabaram sendo liberados com diagnóstico de falso positivo por biologia molecular, o que explicaria a excreção prolongada sem nenhum isolamento ou até mesmo as condições desfavoráveis de coleta e armazenamento das amostras.

Das Re-coletas dos indivíduos, sintomáticos ou não, que ainda estavam positivas e com intervalo entre o 7º e 39º dia após a primeira coleta ou início dos sintomas, 23% foram isolados em cultura de célula. Resultado similar foi obtido por Jeong et al, onde detectou-se vírus viável de voluntários com até 15 dias de curso clínico, de *swabs* de naso/orofaringe, urina e fezes (JEONG et al., 2020). Assim, nossos resultados salientam a necessidade de o indivíduo com a doença retornar às suas atividades sociais somente quando apresentar diagnóstico negativo, corroborando com a primeira recomendação da OMS (27 de maio de 2020) que estabelecia que o indivíduo com Covid-19 volte a suas atividades somente após dois testes negativos. Entretanto, em novembro de 2020 quando foram liberados aos indivíduos sem sintomas, mesmo positivos por qPCR, a voltar à "vida normal", algumas decisões foram tomadas utilizando *softwares* que faziam previsões relativas a relação entre a carga viral e infecciosidade, como é o caso do Estudo de Universidade de *Charité*, liderado pelo Jones e colaboradores, que haviam demonstrado anteriormente que as cargas virais, expressas como RNA/cópias por mL, de amostra de esfregaço inteiro, prevê a probabilidade de isolamento de infecção vírus em cultura celular. Eles também alegaram que o vírus não podia ser isolado de amostras respiratórias após a primeira semana de sintomas, sugerindo que a maior parte da transmissão pára no final da primeira semana de sintomas, e foi acatado pelo governo da Alemanha e outros países da Europa e também o Brasil (JONES et al., 2020, 2021).

Além do exposto, devido à urgência e grande demanda de coleta, para testar participantes com suspeita de Covid-19 nos hospitais durante as primeiras ondas da pandemia, foi difícil rastrear o tipo de meio de transporte em que as amostras eram coletadas, aqui no Brasil e no mundo inteiro. Desta forma, não se pode descartar a hipótese de que o meio de coleta em que as amostras foram enviadas, possa ter sido citotóxico para as células e por isso não houve o isolamento viral em 100% das amostras positivas por qPCR. Também devemos ressaltar que o SARS-Cov-2, por ser um vírus de RNA, estão passivos às RNAses das amostras clínicas, material utilizado para coleta, temperatura de armazenamento entre a coleta e o teste. Outro fator importante é a coleta bem feita e correta. Nos poucos profissionais da saúde estavam aptos a fazerem coletas de *swabs* de oro/nasofaringe com boa qualidade, esses profissionais tiveram que aprender durante a pandemia.

Além do mais, o material utilizado para o isolamento viral (*swab* nasal) pode conter microrganismos da microbiota do paciente. Por isso, mesmo realizando o tratamento das amostras com antibiótico e antifúngico, assim como o uso de meio de cultura com antibiótico integrado em sua formulação, parte das amostras contaminam com fungo ou bactéria, prejudicando as células e conseqüentemente dificultando o isolamento viral.

Todas as amostras deste estudo foram avaliadas em relação ao crescimento viral em culturas de células pela presença de alterações estruturais causadas pelo vírus, conhecidas como efeito citopático (ECP). Observando as imagens obtidas pelo equipamento *Zeiss Axio Observer 2 Microscopy Apotome*, com objetiva de 63x, há diferença entre o efeito citopático da amostra “cov589a” e o efeito das outras amostras analisadas. Essas diferenças podem ser atribuídas a patogenicidade da variante, embora necessitaria de uma amostragem maior para uma avaliação mais precisa. O mesmo se aplica às diferenças morfológicas no efeito citopático entre as imagens de imunofluorescência da cepa ancestral, variantes Gama e Zeta. A variante Gama foi a única que apresentou sincício após 48hs de incubação com aparecimento de pontes citoplasmática, que foi diferente da variante Zeta, que embora tenha apresentado sincício, não apresentou nenhum prolongamento citoplasmático, bem como, ponte citoplasmática. Esse tipo de efeito em alguns vírus está relacionado com maior ou menor patogenicidade, embora para realizar qualquer afirmação, deveriam ser realizados testes *in vivo* com todas as variantes e grupo controle para observarmos se diferença no efeito da variante Gama, pode estar relacionado com algum tipo de dano ou sequelas maiores que as outras variantes de preocupação. No entanto, todas as imagens apresentadas no trabalho enriqueceram a pesquisa e podem contribuir para a construção do conhecimento acerca do SARS-CoV-2.

Quando a população começou a ser vacinada, foram iniciados os experimentos para avaliar as respostas dos voluntários diante a cepa ancestral. Conforme outras variantes surgiram, também foram utilizadas nos experimentos. Com os resultados gerados, foi possível concluir que conforme as vacinas são aplicadas, os títulos das amostras aumentam. Além disso, existe uma relação com a passagem do tempo e queda de anticorpos neutralizantes.

Muitos resultados foram gerados a partir dos experimentos de Neutralização Viral. Por tanto, para uma melhor organização das discussões, os grupos de análises foram separados por tópicos.

6.1. Comparação entre doses de vacinas: 87 participantes acompanhados desde o início do projeto

A exposição dos resultados de experimentos de Neutralização Viral iniciou com a análise de 87 participantes que foram acompanhados desde o início da (Figura 37). É possível observar os resultados referentes às três doses de vacinas mostrando o efeito das vacinações sob as diferentes variantes. A cada dose aplicada, títulos <20 diminuem e os títulos ≥ 20 aumentam. Porém tal efeito não acontece na mesma proporção quando comparado entre as variantes testadas. Os resultados entre cepa ancestral e variante Alfa são similares, assim como Gama e Delta são semelhantes entre si. Porém, a variante Ômicron apresentou resultado menos otimista em comparação às outras variantes, até mesmo com a aplicação da terceira dose. Tal análise é preocupante, e alerta sobre a importância da quarta dose em relação à variante Ômicron e sobre a atualização na produção das vacinas, levando em conta as mutações presentes nessa variante. Alguns estudos reforçam esta ideia, sugerindo que mutações no vírus que causa a Covid-19 podem ser suficientes para favorecer o escape das vacinas (BBC BRASIL, 2022).

Outro fator importante nas análises foi a queda de títulos de anticorpos provavelmente perdidos pela ação do tempo entre a aplicação da terceira dose e coleta de sangue, fazendo com que houvesse diminuição de títulos quando comparados com a segunda dose de vacina, mais uma vez evidenciando a importância da aplicação da quarta dose.

6.2. Comparação entre cepa ancestral e variantes utilizando amostras de vacinados com uma, duas e três doses de vacinas

Amostras de participantes vacinados com uma dose, agrupamento de 10 a 29 dias entre vacinação e coleta de sangue, a média de títulos para cepa ancestral, variantes Gama, Delta e Ômicron é abaixo de 20 (Figura 38). Sendo que a variante Ômicron é a que apresenta a menor média. O resultado sugere que de 10 a 29 dias após a vacina é muito cedo para detectar médias de título acima de 20. Porém, os que tiveram histórico da doença, em todos os períodos de tempo, apresentaram médias altas (estatisticamente similares entre elas), com exceção da variante Ômicron, que mesmo entre os que possuem imunidade híbrida, continua com a menor média de todas. Desta forma, nem mesmo os que tiveram Covid-19 apresentaram títulos com média acima de 50. Nos seguintes intervalos de tempo (acima de 30 dias), entre os

que não tiveram a doença, é possível observar média de títulos acima de 20 para cepa ancestral e variante Alfa, porém a média das outras variantes continua abaixo de 20. Desta forma, a primeira dose não foi suficiente para gerar média de títulos acima de 34 entre os participantes avaliados. Nossa análise é coerente com o estudo feito por Lu et al (LU et al., 2022), no qual foi avaliada a produção de anticorpos neutralizantes de vacinados com uma dose testados com diferentes variantes. Nesse estudo ficou evidente que a variante Ômicron escapa dos anticorpos neutralizantes induzidos tanto pela vacina da Pfizer quanto com a vacina CoronaVac.

Indivíduos avaliados após a aplicação da segunda dose (Figura 39) apresentaram média de títulos mais altos quando comparado com os resultados referentes à primeira dose (Figura 38), com exceção da variante Ômicron. Após a segunda dose, a média mais alta registrada foi de 22, evidenciando que nem mesmo a segunda dose não foi capaz de gerar médias altas de títulos contra essa variante. Outra observação importante a se fazer é sobre a influência do tempo. Dentre os grupos de tempo as médias se mantiveram similares, porém com os participantes que coletaram sangue após 70 dias ou mais, essas médias diminuíram, sugerindo que o tempo pode ser um fator importante no decaimento dos títulos de anticorpos neutralizantes. Já os indivíduos com imunidade híbrida, continuaram com médias altas, com exceção da variante Ômicron que apresentou a maior média (45) no período de tempo de 10 a 29 dias. Depois disso variou entre 20 e 22, mostrando que nem mesmo os que tiveram Covid-19 puderam apresentar títulos altos para essa variante. Foi observado também que, assim como os que não tiveram a doença, neste subgrupo o tempo também foi influenciador no decaimento de títulos. As menores médias foram observadas entre os participantes que coletaram sangue após 70 dias ou mais. Esses dados corroboram estudo realizado pela Fiocruz que também identificou baixa produção de anticorpos neutralizantes para variante Ômicron em vacinados com duas doses (FIOCRUZ, 2022). Além disso, também foi observada a influência do tempo para a queda de títulos. Entre as principais constatações dessa pesquisa foi a importância da aplicação de dose de reforço, já que as análises mostraram uma queda significativa nos níveis de anticorpos, entre três e seis meses após a aplicação da segunda dose.

Antes da chegada da variante Ômicron, a preocupação girava em torno da variante Delta. Com nossas análises, pudemos perceber que apesar de níveis mais baixos de títulos de anticorpos neutralizantes, a Ômicron ainda apresenta resultados

mais preocupantes. Um estudo que avaliou algumas variantes do SARS-CoV-2, também mostrou que a imunidade natural pode gerar anticorpos para variantes Delta. Vacinados com uma dose e sem histórico da doença não apresenta resultados satisfatórios, mas com a aplicação da segunda dose, mesmo esses participantes sem imunidade híbrida, apresentam melhores níveis de anticorpos para Delta (PLANAS et al., 2021).

Na presente pesquisa também foi constatado que as médias aumentam de forma muito expressiva após a aplicação da terceira dose, porém para a variante Ômicron ainda continuam baixas em relação às outras variantes testadas (Figura 40). Observando a situação de forma ampla, é notável que os resultados entre os que não possuem histórico de Covid-19 e os que tiveram a doença são muito similares. Embora os títulos tenham se mantido altos em todos os agrupamentos de tempo, houve um pequeno decaimento gradual entre um agrupamento de tempo e outro. Porém essa diferença é mais notável com os integrantes que coletaram sangue 70 dias ou mais após a vacinação da terceira dose. Nesse período de tempo também é possível notar uma diferença mais acentuada entre os participantes com e sem histórico de Covid-19. Assim, observou-se que de 10 até 69 dias após a vacinação, os participantes sem histórico da doença atingiram resultados muito similares aos que possuem imunidade híbrida. Porém, a partir de 70 dias após a vacinação observa-se que o decaimento de títulos é maior no subgrupo de indivíduos sem histórico da doença. Segundo a Agência de Segurança da Saúde do Reino Unido (BBC BRASIL, 2022) a aplicação da terceira dose é possível reduzir em até 90% as hospitalizações. Porém, essa porcentagem cai para cerca de 75% após três meses, o que corrobora com o que foi percebido no nosso estudo.

É importante salientar que mesmo os participantes com imunidade híbrida não apresentaram títulos com média maior que 101 para a variante Ômicron nem mesmo após a terceira dose da vacina. Tal situação pode explicar o motivo de tantas pessoas terem tido infecção e reinfecção no momento em que essa variante estava em circulação. Tal fato chama atenção para a importância de atualizar a vacina contra a Covid-19.

Diversos estudos corroboram a perda de eficiência da vacina quando comparadas às variantes Delta e Ômicron (ANDREWS et al., 2022). Foi percebido que a eficácia da vacina contra a doença sintomática foi maior para a variante Delta do que para a variante Ômicron. Quando avaliada a vacinação com duas doses, foi

constatado que a proteção foi limitada contra a doença sintomática causada pela variante Ômicron. E que apesar de o reforço vacinal ter melhorado a proteção em comparação com a segunda dose, houve diminuição com o passar do tempo. Em outro estudo, também com ensaio de neutralização viral, foi utilizado pseudovírus e uma biblioteca com anticorpos classificados por seis grupos de epítomos e demonstraram que a variante Ômicron pode escapar de anticorpos monoclonais neutralizantes e também da maioria dos medicamentos à base de anticorpos neutralizantes (CAO et al., 2022). Contraditoriamente Muij et al (MUIK et al., 2022) sugere um aumento significativo na neutralização da variante Ômicron após a aplicação de três doses da vacina Pfizer.

6.3. Comparação entre faixas etárias realizada com cepa ancestral e variantes Delta e Ômicron com indivíduos com uma, duas e três doses

Nas comparações realizadas a partir de amostras de vacinados com uma dose de vacina (Figura 41), não foi observada nenhuma diferença entre as faixas etárias, independente do agrupamento de tempo ou cepa/variante. Corroborando com o observado nas análises anteriores, na maioria das análises os títulos estavam baixos, sendo que com para variante Ômicron as médias estavam ainda menores, independentemente da idade.

Já nas análises dos indivíduos vacinados com duas doses (Figura 42), muitas diferenças estatisticamente significativas foram notadas. Em todos os casos que houve diferença, os mais jovens apresentaram maior média de títulos de anticorpos neutralizante. Desta forma, além de ter maior chance de complicações durante a infecção por Covid-19 (Tabela 3), as pessoas com idade mais avançada e vacinadas com duas doses, ainda correm o risco de produzirem títulos menores em comparação com os mais jovens.

Essas diferenças são vistas com menos frequência com os vacinados com três doses (Figura 43) e só surgem no agrupamento com coleta de sangue igual ou maior que 70 dias. Assim é possível notar que a aplicação da terceira dose fez com que os participantes avaliados permanecessem com títulos similares, independentemente da idade, durante o período de 10 a 69 dias. A partir de 70 dias, assim como em análises anteriores, há um decaimento de títulos de anticorpos e essas diferenças voltam a surgir, porém com menos intensidade quando comparado nas análises de indivíduos vacinados com duas doses.

6.4. Comparação entre vacinas, testadas com cepa ancestral realizada a partir de amostras de participantes com uma, duas e três doses

Nestas análises nem todos os subgrupos foram apresentados devido ao número de amostras disponíveis com esse perfil. Como já foi observado anteriormente, os títulos de indivíduos sem histórico de Covid-19 e vacinados com uma dose, possuem média baixa (Figura 44). Mesmo assim, houve diferença entre as vacinas, sendo que a vacina Pfizer apresentou média de título maior quando comparada com participantes vacinados com AstraZeneca e CoronaVac. Na única análise possível com o subgrupo de imunidade híbrida não houve diferença entre os vacinados avaliados (AstraZeneca e Pfizer).

Entre os vacinados com duas doses (Figura 45) também houveram diferenças estatisticamente significantes entre as vacinas, tanto nos subgrupos sem histórico de Covid-19, como na única análise realizada com os participantes com imunidade híbrida. Em todas as análises, os vacinados com Pf/Pf apresentaram títulos maiores, em seguida foram os vacinados com Az/Az e com títulos mais baixos, Cv/Cv.

Já nas análises realizadas com participantes vacinados com três doses (Figura 46), há uma pequena diferença entre as combinações de vacinas Cv/Cv/Pf e Pf/Pf/Pf, sendo que a primeira combinação apresentou média de título mais alta. Nos outros agrupamentos de tempo e subgrupos, não há diferenças estatísticas entre elas. Portanto, a aplicação da terceira dose favoreceu o equilíbrio entre as médias de títulos dos vacinados com as diferentes combinações de vacinas avaliadas neste trabalho. Contudo, todas as amostras de vacinados com três doses são de participantes que receberam Pfizer como última dose. Assim, dada essa característica da amostragem, não é possível generalizar se com outras vacinas aplicadas na terceira dose apresentaria esse equilíbrio entre a média de títulos. Um estudo realizado pela Fiocruz também mostrou que a resposta imune se torna ainda mais forte e robusta quando vacinados com CoronaVac recebe como reforço a vacina Pfizer (FIOCRUZ, 2022).

6.5. Comparação entre sexos, testadas com cepa ancestral e variantes, com integrantes vacinados com uma, duas e três doses

Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa nas análises realizadas com vacinados com uma dose de vacina (Figura 47). Porém, houve o registro de diferenças com os vacinados com duas e três doses (Figura 48 e 49 respectivamente), sendo duas delas pouco expressivas e em apenas uma das

variantes. As únicas diferenças que se repetiram entre três variantes (Alfa, Gama e Delta) ocorreram no agrupamento de 70 dias ou mais, subgrupo de indivíduos sem histórico de Covid-19, onde participantes do sexo feminino apresentaram queda mais acentuada quando comparado com o sexo masculino. Essa diferença foi pouco expressiva e observada justamente no momento onde existe uma queda de anticorpos provavelmente provocada pela ação do tempo, visto em análises anteriores.

6.6. Comparação de títulos de neutralização viral, realizada a partir de amostras de vacinados com uma, duas e três doses. Comparação entre cepa ancestral e Delta e também entre cepa ancestral e Ômicron

Desde o primeiro resultado relacionado com a soroneutralização ficou evidente que a média de títulos de anticorpos para variante Delta e principalmente Ômicron é mais baixa quando comparado com a cepa ancestral.

Quando se trata da variante Delta, é possível perceber que não houve diferença muito discrepante entre os subgrupos de participantes com e sem histórico de Covid-19. Mas quando se trata da comparação entre a cepa ancestral e variante Ômicron, os resultados foram muito diferentes. Entre os que não tiveram infecção, a diferença não foi muito discrepante porque a primeira dose não gerou muito título para cepa ancestral e tampouco para Ômicron. Os indivíduos com imunidade híbrida tiveram uma boa produção de anticorpos para cepa ancestral, mas não ocorreu o mesmo com a variante Ômicron. Isso fez com que a diferença entre as duas ficasse mais intensa. O mesmo foi observado em um estudo da China. Neste caso, os pesquisadores compararam os títulos de anticorpos neutralizantes entre cepa ancestral e variante Ômicron de participantes com histórico de Covid-19, sem vacinação. A diferença entre elas foi de até 17 vezes. A diferença foi grande porque a maioria das amostras testadas para Ômicron mostraram-se negativas para anticorpos neutralizantes, o que indica que o potencial de escape imunológico dessa variante é alto (ZHAO et al., 2022).

As análises realizadas com os vacinados com duas doses (Figura 54) não manteve o mesmo padrão. A diferença foi grande até entre os indivíduos sem histórico da doença. Nesse caso, os dois subgrupos começaram a produzir títulos de anticorpos para cepa ancestral, seja somente por ação da vacina ou pela imunidade híbrida. Porém os títulos para variante Ômicron continuaram muito baixos ou <20, fazendo com que a diferença ficasse exagerada.

Para os vacinados com três doses foram realizadas 3 análises (Figura 55). O agrupamento de 10 a 29 dias e sem histórico de Covid-19 apresentou diferença de 18,37x. Isso porque a terceira dose gerou títulos altos para cepa ancestral, mas esses participantes não produziram títulos altos para variante Ômicron. No agrupamento de 70 dias ou mais, a diferença dos dois subgrupos ficou entre aproximadamente 12x. Mostrando que embora os títulos para cepa Ancestral estejam altos, os da Ômicron continuam baixos. Além disso, ter imunidade híbrida não garantiu vantagens para aumentar os títulos da variante Ômicron.

Tais resultados sugerem que as vacinas avaliadas, uma vez tendo como alvo neutralizante a RDB da cepa ancestral de Wuhan, não possuem a mesma eficiência para todas as variantes, principalmente para Ômicron. Todas as mudanças evolutivas dessa variante garantiram vantagens sobre as vacinas, até mesmo sobre aqueles com imunidade híbrida. Por tanto, é recomendável que as próximas vacinas sejam desenvolvidas com base em variantes mais atuais.

6.7. Correlação entre título de anticorpos neutralizantes e tempo: cepa ancestral, variante Ômicron e ambas com amostras pareadas

Na figura 56, onde há amostras de participantes que iniciaram o esquema vacinal com CoronaVac, com e sem histórico de Covid-19 (Figura 56-A e B), inicialmente há um acúmulo de amostras com títulos menores que 20 ou muito baixos que vão aumentando no decorrer do tempo, já que são aplicadas as segunda e terceira doses. Similar ocorreu com os que iniciaram o esquema vacinal com AstraZeneca ou Pfizer, sem histórico da doença (Figura 56-C). Mas na análise com amostras de indivíduos que tiveram a doença (Figura 56-D), não houve correlação entre título de VNT e tempo. Isso aconteceu porque houve um acúmulo de títulos mais altos de grande parte das amostras desde o início da linha do tempo (imunidade natural por infecção) e se mantiveram altos conforme as outras doses foram aplicadas.

A mesma análise foi realizada com amostras testadas com variante Ômicron. Com os que iniciaram o esquema vacinal com CoronaVac, com e sem histórico da doença (Figura 57-A e B), houve acúmulo de amostras com títulos menores que 20 e títulos baixos no início da linha do tempo, e aumentou gradativamente ao decorrer das vacinações. Porém esse aumento foi muito pequeno quando comparado com a cepa ancestral. Mais uma vez foi possível perceber que nem mesmos os participantes com

imunidade híbrida possuem algum tipo de vantagem quando se trata da variante Ômicron.

Foi realizada uma análise só com amostra pareadas, ou seja, todas elas foram testadas tanto para cepa ancestral como para variante Ômicron (Figura 58). O fato de as duas estarem presentes no mesmo gráfico (com cores diferentes), ajuda a visualizar melhor como foi o comportamento da resposta dos indivíduos e observar a diferença entre cepa ancestral e variante Ômicron (Figura 58). Foi observado que conforme o número de vacinas, maior o título de anticorpos neutralizantes. Contudo, devido que as vacinas foram baseadas para cepa ancestral e o fato de que a variante Ômicron possui muitas mutações, os títulos para essa variante se mostraram sempre muito mais baixos. Por tanto existe a possibilidade de essas mutações terem dificultado a geração de anticorpos neutralizantes contra a variante Ômicron, como explicado em parágrafos anteriores. Outro estudo também mostrou que os títulos de anticorpos neutralizantes para variante Ômicron foram significativamente menores do que para a cepa ancestral em plasma coletado antes de novembro de 2021 (GALLIAN et al., 2022) corroborando o que foi apresentado aqui. Além disso, é importante salientar o que foi observado com os participantes com imunidade híbrida. O histórico de Covid-19 apresentou ter relação direta com o aumento de títulos de anticorpos neutralizantes. Porém, quando se trata da variante Ômicron, essa relação não é tão forte como o observado com a cepa ancestral e com as outras variantes de preocupação (VOCs).

7. CONCLUSÕES

7.1. Conclusão Geral

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram avaliar a viabilidade do vírus SARS-CoV-2 em amostras clínicas de pacientes com Covid-19 em diferentes períodos da infecção, bem como determinar títulos de anticorpos neutralizantes, através do teste de neutralização viral por efeito citopático (VNT-ECP) em soros de indivíduos vacinados com diferentes vacinas:

7.2. Conclusões Específicas

7.2.1. Avaliação da viabilidade do vírus SARS-CoV-2 em amostras clínicas:

- Da avaliação da viabilidade de vírus infeccioso em amostras clínicas de pacientes com Covid-19 em diferentes períodos da infecção, bem como de re-coletas sucessivas tendo como parâmetro a positividade por Real Time PCR (qPCR), foi possível concluir que 23% das re-coletas de pacientes positivos e 5% das re-coletas de pacientes negativos (com intervalo de 7 até 39 dias após o início dos sintomas) tiveram SARS-CoV-2 isolados em cultura de células. Sugerindo que os vírus excretados por estes indivíduos possuem um potencial de infecção e possivelmente transmissibilidade.
- Nosso trabalho demonstra que a viabilidade viral está mais estatisticamente relacionada com a carga viral do que com o tempo de excreção. Onde as amostras que possuem carga viral maior que $3,07E+06$ ($Ct < 19$) são 97% isoladas, sendo conseqüentemente mais infecciosa e transmissível do que as amostras que possuem carga viral menor que $1,90E+03$ ($Ct > 30$) que correspondem a 15% de viabilidade viral e infectibilidade.
- A avaliação da eficiência de isolamento das amostras congeladas em comparação com as que foram mantidas em geladeira, concluiu-se que para o isolamento viral não houve diferença estatisticamente significativa entre amostras congeladas e as que foram mantidas em geladeira por até dois dias. De modo geral, foi concluído que a utilização de amostras de *swab* nasal para a tentativa de isolamento de vírus SARS-CoV-2 é efetivo.

7.2.2. Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes, através do teste de neutralização (VNT-ECP) em soros de indivíduos vacinados com diferentes vacinas

- A avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes em soros de indivíduos vacinados com uma, duas e três doses de diferentes vacinas utilizadas no Brasil, utilizando cepa ancestral e variantes Alfa, Gama, Delta e Ômicron, foi possível concluir que conforme que as vacinas são aplicadas, os títulos das amostras

aumentam. Além disso, existe uma relação com a passagem do tempo e queda de anticorpos neutralizantes.

- Foi observado também que existem diferenças nos títulos de anticorpos neutralizantes dependendo da variante testada. Desta forma foi concluído que ao modo que mutações foram favorecendo o surgimento de novas variantes, o efeito da vacina diminuiu. Mas os integrantes com imunidade híbrida não foram afetados por essa diminuição. Essa vantagem não é tão exacerbada entre os vacinados com a terceira dose, concluindo que a terceira dose contribuiu para que os resultados sejam similares entre participantes com e sem imunidade híbrida.
- Em relação às vacinas avaliadas, foi concluído que houve diferença entre elas quando analisadas amostras de vacinados com primeira e segunda doses. Sendo que amostras de vacinados com Pfizer apresentaram títulos maiores, em seguida os vacinados com AstraZeneca e por último CoronaVac. Porém essas diferenças não foram observadas com os que receberam a terceira dose, concluindo-se que a aplicação da terceira dose com vacina Pfizer nivelou as diferenças observadas nas doses anteriores.
- Embora com a variante Ômicron também haja a relação entre aumento de título e doses de vacina, quando comparada com a cepa ancestral os resultados são menos otimistas. Para essa variante os títulos das amostras foram muito baixos e nem mesmo as amostras de indivíduos com imunidade híbrida puderam apresentar títulos altos ou vantagens significativas. Com isso, foi concluído que existe a necessidade de atualização das vacinas contra Covid-19, já que as vacinas disponíveis foram baseadas na cepa ancestral.

7.2.3. Análise dos resultados obtidos com a neutralização viral levando em conta a faixa etária, dose de vacina, tempo após vacinação, variante do SARS-CoV-2, histórico de Covid-19

- Em relação à faixa etária foi concluído que amostras de vacinados com duas doses, os participantes de 18 a 29 anos apresentaram títulos mais altos. Essa diferença é nivelada com a aplicação da terceira dose e se mantém por um período de até 69 dias.

REFERÊNCIAS

ACTIV-3/TICO LY-COV555 STUDY GROUP. A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 10, p. 905–914, 11 mar. 2021.

ALMEIDA, F. J. et al. Hematuria Associated With SARS-CoV-2 Infection in a Child. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 39, n. 7, p. e161–e161, 2020.

ALMEIDA, J. D.; BERRY, D. M. CH CUNNINGHAM, D. HAMRE, MS HOFSTAD, L. Mallucci. **K. McIntosh, and DAJ TYRRELL: Coronaviruses. Nature (Lond.)**, v. 220, p. 650, 1968.

ANDREWS, N. et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B. 1.1. 529) variant. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 16, p. 1532–1546, 2022.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Vacinas - Covid-19**. , 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>>

ANVISA, A. N. DE V. S. **Anvisa regulamenta a utilização de autotestes para Covid-19**. , 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-regulamenta-a-utilizacao-de-autotestes-para-covid-19>>

AOKI, M. N. et al. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021.

ARAUJO, D. B. 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**, v. 115, 2020.

BBC BRASIL, B. B. C. N. B. **Covid: por que algumas vacinas protegem por mais tempo do que outras**. , 2022. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-61757409>>

BUONAFINE, C. P. et al. High prevalence of SARS-CoV-2 infection among symptomatic healthcare workers in a large university tertiary hospital in São Paulo, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2020.

CALDAS, L. A. et al. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.

CAO, Y. et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. **Nature**, v. 602, n. 7898, p. 657–663, 2022.

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19)**. CDC. , 2019a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **People with Certain Medical Conditions**. CDC. , 2019b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Public Health image Library PHIL**. CDC. , 2020. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15523>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. Risk for COVID-19 infection, hospitalization, and death by age group. 2021.

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Introduction to Epidemiology**. CDC. , 2022a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section11.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **Plague**. CDC. , 2022b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/plague/index.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **History of Smallpox**, CDC. , 2022c. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **1918 Pandemic (H1N1 virus)**. , 2022d. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1918-pandemic-h1n1.html>>

CDC, C. FOR D. C. AND P. **2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus)** . , 2022e. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html>>

CHAVDA, V. P.; PATEL, A. B.; VAGHASIYA, D. D. SARS-CoV-2 variants and vulnerability at the global level. **Journal of Medical Virology**, 2022.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 2020.

CHERRY, J. D. The chronology of the 2002–2003 SARS mini pandemic. **Paediatric respiratory reviews**, v. 5, n. 4, p. 262–269, 2004.

COPIN, R. et al. In vitro and in vivo preclinical studies predict REGEN-COV protection against emergence of viral escape in humans. 2021.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature reviews microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

DASA. **Quais são as diferenças entre os exames PCR e Sorologia**. , 2020. Disponível em: <<https://dasa.com.br/exames-covid-sorologia-pcr>>

DE PAULIS, M. et al. Multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19 with neurologic manifestations in a child: a brief report. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 39, n. 10, p. e321–e324, 2020.

DORLASS, E. G. et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1117–1123, 2020.

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967–1976, 2003.

ESSALMANI, R. et al. Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. **Journal of virology**, v. 96, n. 8, p. e00128–22, 2022.

EUROPEAN CDC, E. C. FOR D. P. AND C. **Rapid Risk Assessment: Cluster of pneumonia cases caused by a novel coronavirus, Wuhan, China, 2020**. , 2020a. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-cluster-pneumonia-cases-caused-novel-coronavirus-wuhan>>

EUROPEAN CDC, E. C. FOR D. P. AND C. **Guidance for discharge and ending isolation in the context of widespread community transmission of COVID-19, 8 April 2020**. ECDC Stockholm, , 2020b.

FIOCRUZ, F. O. C. **Testes para a Covid-19: como são e quando devem ser feitos**. , 2020. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/testes-para-covid-19-como-sao-e-quando-devem-ser-feitos>>

FIOCRUZ, F. O. C. **Covid-19: Pesquisa avalia resposta gerada por vacinas ao longo de um ano**. , 2022. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/covid-19-pesquisa-avalia-resposta-gerada-por-vacinas-ao-longo-de-um-ano>>

FORNI, D. et al. Molecular evolution of human coronavirus genomes. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 1, p. 35–48, 2017.

GALLIAN, P. et al. Reduced neutralizing antibody potency of COVID-19 convalescent vaccinated plasma against SARS-CoV-2 Omicron variant. **Vox Sanguinis**, 2022.

GE, Z. et al. Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 21, n. 5, p. 361–368, 2020.

GODINO, C. et al. Antithrombotic therapy in patients with COVID-19?-Rationale and Evidence. **International journal of cardiology**, v. 324, p. 261–266, 2021.

HAMNER, L. High SARS-CoV-2 attack rate following exposure at a choir practice—Skagit County, Washington, March 2020. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, 2020.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 2020.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, 2020.

JHU, J. H. U. **WORLD COUNTRIES, BRAZIL, OVERVIEW**. , 2022a. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/region/brazil>>

JHU, J. H. U. **Cumulative Cases By Days Since 50th Confirmed Case**. , 2022b. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/data/new-cases>>

JONES, T. C. et al. An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age. **MedRxiv**, 2020.

JONES, T. C. et al. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. **Science**, v. 373, n. 6551, p. eabi5273, 2021.

KRONBICHLER, A. et al. Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis. **International journal of infectious diseases**, v. 98, p. 180–186, 2020.

LA SCOLA, B. et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 1059–1061, 2020.

LAFERL, H. et al. An approach to lifting self-isolation for health care workers with prolonged shedding of SARS-CoV-2 RNA. **Infection**, v. 49, n. 1, p. 95–101, 2021.

LAMERS, M. M. et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. **Science**, v. 369, n. 6499, p. 50–54, 2020.

LECHIEN, J. R. et al. Clinical and epidemiological characteristics of 1420 European patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019. **Journal of internal medicine**, v. 288, n. 3, p. 335–344, 2020.

LEDNICKY, J. A. et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 100, p. 476–482, 2020.

LI, N.; WANG, X.; LV, T. Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: not a rare phenomenon. **Journal of medical virology**, 2020.

LIU, J. et al. Community transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Shenzhen, China, 2020. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 6, p. 1320, 2020a.

LIU, S. T. H. et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score–matched control study. **Nature medicine**, v. 26, n. 11, p. 1708–1713, 2020b.

LIU, Y.-C.; KUO, R.-L.; SHIH, S.-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical journal**, v. 43, n. 4, p. 328–333, 2020.

LU, L. et al. Neutralization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 omicron variant by sera from BNT162b2 or CoronaVac vaccine recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, n. 1, p. e822–e826, 2022.

MACHADO, R. R. G. et al. Hypertonic saline solution inhibits SARS-CoV-2 in vitro assay. **bioRxiv**, 2020.

MAROVICH, M.; MASCOLA, J. R.; COHEN, M. S. Monoclonal antibodies for prevention and treatment of COVID-19. **Jama**, v. 324, n. 2, p. 131–132, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Painel Coronavírus**. , 2022. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br>>

MODROW, S. et al. Viruses with single-stranded, positive-sense RNA genomes. **Molecular virology**, p. 185, 2013.

MUIK, A. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron by BNT162b2 mRNA vaccine–elicited human sera. **Science**, v. 375, n. 6581, p. 678–680, 2022.

NURTOP, E. et al. Combination of ELISA screening and seroneutralisation tests to expedite Zika virus seroprevalence studies. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2018.

OUR WORLD IN DATA. **Daily share of the population receiving a first COVID-19 vaccine dose.** , 2022. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=BRA>>

PEIRIS, J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319–1325, 2003.

PLANAS, D. et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. **Nature**, v. 596, n. 7871, p. 276–280, 2021.

PRITCHARD, M. et al. ISARIC COVID-19 Clinical Data Report: 4 October 2020. **MedRxiv**, 2020.

RABI, F. A. et al. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

SALIM, A.; LAN, R.; REEVES, P. R. Vibrio cholerae pathogenic clones. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 11, p. 1758, 2005.

SBV. **Produção de variantes de SARS-CoV-2. Sociedade Brasileira de Virologia**, 2022. Disponível em: <<https://www.sbv.org.br/index.php?page=noticia&id=3841>>

SEKINE, L. et al. Convalescent plasma for COVID-19 in hospitalised patients: an open-label, randomised clinical trial. **European Respiratory Journal**, v. 59, n. 2, 2022.

SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of advanced research**, v. 24, p. 91–98, 2020.

SU, S. et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, 2016.

SUNGNAK, W. et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 681–687, 2020.

TANG, N. et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 5, p. 1094–1099, 2020.

TYRRELL, D. A. J.; BYNOE, M. L. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. **British medical journal**, v. 1, n. 5448, p. 1467, 1965.

UNESP. **Desenvolvimento de kit de RT-PCR para diagnóstico de COVID-19**. , 2020. Disponível em: <<https://www.clp.unesp.br/#!/noticia/275/desenvolvimento-de-kit-de-rt-PCR-para-diagnostico-de-covid-19>>

WALLS, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292, 2020.

WEINREICH, D. M. et al. REGEN-COV antibody cocktail clinical outcomes study in Covid-19 outpatients. **MedRxiv**, 2021.

WENDEL, S. et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. **Transfusion**, v. 60, n. 12, p. 2938–2951, 2020.

WHO, W. H. O. **Epidemic and pandemic-prone diseases. MERS situation update, December 2019**. , 2019. Disponível em: <<https://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-december-2019.html>>

WHO, W. H. O. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 73. 2020a.

WHO, W. H. O. **Criteria for releasing COVID-19 patients from isolation**. , 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/criteria-for-releasing-covid-19-patients-from-isolation>>

WHO, W. H. O. **WHO collaborative multi-centre research project on Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) diagnosis**. , 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/initiatives/who-collaborative-multi-centre-research-project-on-severe-acute-respiratory-syndrome-\(sars\)-diagnosis](https://www.who.int/initiatives/who-collaborative-multi-centre-research-project-on-severe-acute-respiratory-syndrome-(sars)-diagnosis)>

WHO, W. H. O. **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1>. Acesso em: 22 jan. 2023a.

WHO, W. H. O. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. , 2022b. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/tracking-SARS-CoV-2-variants>>

WHO, W. H. O. **Previously circulating VOIs**. , 2022c. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/previously-circulating-vois>>

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 2012.

ZHAO, X. et al. Effects of a prolonged booster interval on neutralization of Omicron variant. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 9, p. 894–896, 2022.

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

ZHU, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, 2020.

APÊNDICES

Apêndices disponíveis em:

https://drive.google.com/drive/folders/1_WdWTTsRj0NDHX0TopJllpDGKI8mhQGJ?usp=sharing



A. APÊNDICE A: Vídeos A1 e A2

Realizados a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. 1- Controle negativo acompanhado por 68 horas. 2- Controle negativo acompanhado por 140 horas.

B. APÊNDICE B: Vídeos B1 e B2

Realizados a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. 1- Controle positivo, cepa ancestral acompanhado por 68 horas, MOI 0,02 disponível em. 2- Controle positivo, cepa ancestral por 140 horas.

C. APÊNDICE C: Vídeo C

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos, durante 140 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Controle negativo.

D. APÊNDICE D: Vídeo D

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos, durante 140 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Amostra “Cov 70a”.

E. APÊNDICE E: Vídeo E

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos, durante 68 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Controle positivo variante Gama.

F. APÊNDICE F: Vídeo F

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 10x, feitas a cada 10 minutos, durante 68 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Controle positivo variante Zeta.

G. APÊNDICE G: Vídeo G

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 63x, feitas a cada 10 minutos, durante 57 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Controle positivo, cepa ancestral.

H. APÊNDICE H: Vídeo H

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 63x, feitas a cada 10 minutos, durante 57 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Amostra “Cov 589a”.

I. APÊNDICE I: Vídeo I

Realizado a partir de fotografias com objetiva de 63x, feitas a cada 10 minutos, durante 57 horas com o *Incubator Microscope zenCELL owl*. Controle negativo.

J. APÊNDICE J: Origem das amostras clínicas do biorrepositório.

HICF: Hospital Infantil Cândido Fontoura; HU: Hospital Universitário (USP); LVCM: Laboratório de Virologia Clínica e Molecular; STA: Santa Casa; HGDP: Hospital Geriátrico Dom Pedro II; SLG: Hospital São Luiz Gonzaga; HSCM: Santa Casa de Misericórdia; HIMJ: Hospital Infantil Municipal Menino Jesus. NR: não realizada.

K. APÊNDICE K: Amostragem de soros


Utilizados nos experimentos de soroneutralização. Coluna 1: identificação da amostra; Coluna 2: identificação do participante. Coluna 3: idade. Coluna 4: sexo (F-

feminino e M- masculino). Coluna 5: origem da amostra (LVCM: Laboratório de Virologia Clínica e Molecular – USP e HIMJ: Hospital Infantil Menino Jesus). Coluna 6: histórico de Covid-19 (não: sem histórico, 1x: histórico de uma infecção, 2x: histórico de reinfeção). Colunas 7, 8 e 9: respectivamente, primeira, segunda e terceira doses (não: pré-vacina, A: AstraZeneca, C: CoronaVac, J: Janssen, P: Pfizer). Coluna 10: número de dias entre a última vacina recebida e coleta de sangue. Coluna 11: número de doses recebidas. Colunas 12, 13, 14, 15, 16: resultados de títulos de anticorpos neutralizantes de cepa ancestral, variantes Gama, Alfa, Delta e Ômicron.

ANEXOS

A. ANEXO A: Exemplo de laudo (VNT/ELISA/qPCR)

Fornecido aos voluntários que participaram da pesquisa de anticorpos neutralizantes.



DEPARTAMENTO DE Microbiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - CEP: 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
fone : 55 11 - 3091.7293 e-mail: danibruna@gmail.com

Laudo VNT/ELISA/qPCR

Nome: [redacted] idade: 38 anos CPF: [redacted]

Vacina: CoronaVac - 1º dose 10/02/2021 2º dose 04/03/2021 3º dose 09/11/2021 (Pfizer)

Identificação do procedimento: Titulação de anticorpos neutralizantes e Detecção molecular de SARS.CoV-2
Métodos Utilizados: Teste de Neutralização Viral por Efeito Citopático (VNT-ECP), Sorologia pelo método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real (qPCR).

Identificação da amostra/Resultados: REFERÊNCIAS:

Tipo de amostra: Soro (Elisa e VNT) SNF/SOF (qPCR)
Resultado ELISA: anticorpos IgG
Resultado VNT₁₀₀: título de anticorpos neutralizantes
Resultado qPCR: Detecção de gene-E de sars.cov-2
*em 11/01/22 Ct 23.00 (1 d.p.s); ** Ct 35.36; *** Ct 41.00


	VNT	ELISA	qPCR
≥ 20 - Presença de anticorpos neutralizantes específicos para Sars.Cov-2 e suas variantes	D.O ≥ 0.4 - Reagente	Ct < 37.99 = Positivo	
< 20 - Abaixo do limite de detecção da técnica de VNT ₁₀₀	D.O < 0.4 - Não reagente	Ct > 38.00 = Negativo	

Sars.Cov-2 variants	coleta 21/01/22	coleta 26/01/22	coleta 10/05/22	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta
VNT ₁₀₀	B	1280	≥2560	320					
	P1 (Gamma)	640	≥2560	320					
	B.1.1.7 (Alfa)	1280	≥2560	160					
	DELTA	320	160	160					
	Ômicron	-	-	40					
ELISA-IgG	RBD	Reagente	Reagente	Reagente					
	NP	Regente	Regente	Reagente					
qPCR	SNF/SOF	**Positivo	***Positivo	Negativo					


Legenda: IgG - imunoglobulina do tipo G; VNT-ECP - teste de neutralização viral por efeito citopático; ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática; D.O - Densidade Óptica; NR - não reagente; RBD - domínio de receptor de adsorção (SPIKE) de SARS.CoV-2; NP - região da nucleoproteína; -- teste não realizado; SNF/SOF - Swab de nasofaringe e orofaringe; qPCR - teste de PCR em tempo real; EA - em andamento.

Interpretação: títulos menores que 20 em vacinados após a 2ª dose, não significa necessariamente a ausência de anticorpos, pode significar decaimento dos títulos, mas que ainda podem ser títulos de 5 ou 10 com atividades neutralizantes, embora abaixo do cut off padronizado pelo LVCM. Títulos maiores que 20, foram demonstrados em células, capazes de neutralizar o vírus de forma eficiente. O teste de ELISA é realizado com proteínas da nucleoproteína "N" e da região RBD da spike do vírus, para confirmação da produção de títulos de IgG contra as duas proteínas testadas por infecção natural e vacina CoronaVac (reagente nas duas regiões) ou pela vacina AstraZeneca, Janssen & Johnson e Pfizer (reagentes apenas para RBD). Títulos neutralizantes com menos de 20 dias da primeira dose, podem significar uma infecção prévia, por SARS.CoV-2. O qPCR detecta fragmentos do gene E de Sars.Cov-2 em infectados.

São Paulo, 1 de outubro de 2022.



Prof. Dr. Edison Luiz Durigon
Prof. Titular
ICB II – USP








Dra. Danielle B. L. Oliveira
Pesquisadora
ICB II-USP

Nota: Este resultado é referente a participação no Projeto de Pesquisa "Resposta Imune-humoral contra SARS.CoV-2 e suas variantes em vacinados, utilizando a técnica de neutralização viral -VNT e ELISA", o qual possui o objetivo de avaliar a resposta imune-humoral, titulando os valores de produção de anticorpos neutralizantes (Nabs) para determinar a porcentagem de vacinados produtores de anticorpos contra SARS.CoV-2. O trabalho é uma parte da tese de doutorado de Erika Donizetti de Oliveira Candido. E o número CEAA: 39339920.10000.5467.

Laboratório de Virologia Clínica e Molecular - LVCM
Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas / USP

B. ANEXO B: Exemplo de laudo (VNT/ELISA)

Fornecido aos voluntários que participaram da pesquisa de anticorpos neutralizantes.

	 DEPARTAMENTO DE MICROBiologia UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO																																																																																													
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900 – São Paulo, SP - Brasil fone : 55 11 - 3091.7293 e-mail: danibruna@gmail.com																																																																																														
Laudo VNT/ELISA		nº: SoC [redacted]																																																																																												
Nome: [redacted]		CPF: [redacted]																																																																																												
Vacina: Pfizer - 1º dose 07/06/2021 - 2º dose 06/08/2021 - 3º dose em 12/02/2022 (Pfizer)																																																																																														
Identificação do procedimento: Titulação de anticorpos neutralizantes e Detecção molecular de SARS.CoV-2 Métodos Utilizados: Teste de Neutralização Viral por Efeito Citopático (VNT-ECP), Sorologia pelo método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real (qPCR).																																																																																														
Identificação da amostra/Resultados:	REFERÊNCIAS:																																																																																													
Tipo de amostra: Soro (Elisa e VNT) SNF/SOF (qPCR)																																																																																														
Resultado ELISA: anticorpos IgG																																																																																														
Resultado VNT₁₀₀: título de anticorpos neutralizantes																																																																																														
Resultado qPCR: Detecção de gene-E de sars.Cov-2																																																																																														
*PCR em tempo real positivo = Ct 23.75																																																																																														
	<table border="1"><thead><tr><th>VNT</th><th>ELISA</th><th>qPCR</th></tr></thead><tbody><tr><td>≥ 20 - Presença de anticorpos neutralizantes específicos para Sars.Cov-2 e suas variantes</td><td>D.O ≥ 0.4 - Reagente</td><td>Ct < 37.99 = Positivo</td></tr><tr><td>< 20 - Abaixo do limite de detecção da técnica de VNT₁₀₀</td><td>D.O < 0.4 - Não reagente</td><td>Ct > 38.00 = Negativo</td></tr></tbody></table>	VNT	ELISA	qPCR	≥ 20 - Presença de anticorpos neutralizantes específicos para Sars.Cov-2 e suas variantes	D.O ≥ 0.4 - Reagente	Ct < 37.99 = Positivo	< 20 - Abaixo do limite de detecção da técnica de VNT ₁₀₀	D.O < 0.4 - Não reagente	Ct > 38.00 = Negativo																																																																																				
VNT	ELISA	qPCR																																																																																												
≥ 20 - Presença de anticorpos neutralizantes específicos para Sars.Cov-2 e suas variantes	D.O ≥ 0.4 - Reagente	Ct < 37.99 = Positivo																																																																																												
< 20 - Abaixo do limite de detecção da técnica de VNT ₁₀₀	D.O < 0.4 - Não reagente	Ct > 38.00 = Negativo																																																																																												
<table border="1"><thead><tr><th>Sars.Cov-2 variants</th><th>coleta 17/02/22</th><th>coleta 09/05/22</th><th>coleta 06/06/22</th><th>coleta</th><th>coleta</th><th>coleta</th><th>coleta</th><th>coleta</th><th>coleta</th></tr></thead><tbody><tr><td rowspan="5">VNT₁₀₀</td><td>B</td><td>1280</td><td>160</td><td>640</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>P1 (Gamma)</td><td>640</td><td>160</td><td>320</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>B.1.1.7 (Alfa)</td><td>640</td><td>640</td><td>640</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Delta</td><td>640</td><td>80</td><td>160</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Omicron</td><td>-</td><td>20</td><td>40</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td rowspan="2">ELISA-IgG</td><td>RBD</td><td>Reagente</td><td>Reagente</td><td>Reagente</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>NP</td><td>NR</td><td>NR</td><td>NR</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>qPCR</td><td>SNF/SOF</td><td>Negativo</td><td>-</td><td>Positivo*</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></tbody></table>	Sars.Cov-2 variants	coleta 17/02/22	coleta 09/05/22	coleta 06/06/22	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta	VNT ₁₀₀	B	1280	160	640						P1 (Gamma)	640	160	320						B.1.1.7 (Alfa)	640	640	640						Delta	640	80	160						Omicron	-	20	40						ELISA-IgG	RBD	Reagente	Reagente	Reagente						NP	NR	NR	NR						qPCR	SNF/SOF	Negativo	-	Positivo*														
Sars.Cov-2 variants	coleta 17/02/22	coleta 09/05/22	coleta 06/06/22	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta	coleta																																																																																					
VNT ₁₀₀	B	1280	160	640																																																																																										
	P1 (Gamma)	640	160	320																																																																																										
	B.1.1.7 (Alfa)	640	640	640																																																																																										
	Delta	640	80	160																																																																																										
	Omicron	-	20	40																																																																																										
ELISA-IgG	RBD	Reagente	Reagente	Reagente																																																																																										
	NP	NR	NR	NR																																																																																										
qPCR	SNF/SOF	Negativo	-	Positivo*																																																																																										
Legenda: IgG - imunoglobulina do tipo G; VNT-ECP - teste de neutralização viral por efeito citopático; ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática; D.O - Densidade Óptica; NR - não reagente; RBD - domínio de receptor de adsorção (SPIKE) de SARS.CoV-2; NP - região da nucleoproteína; -- teste não realizado; SNF/SOF - Swab de nasofaringe e orofaringe; qPCR- teste de PCR em tempo real; EA- em andamento.																																																																																														
Interpretação: títulos menores que 20 em vacinados após a 2º dose, não significa necessariamente a ausência de anticorpos, pode significar decaimento dos títulos, mas que ainda podem ser títulos de 5 ou 10 com atividades neutralizantes, embora abaixo do cut off padronizado pelo LVCM. Títulos maiores que 20, foram demonstrados em células, capazes de neutralizar o vírus de forma eficiente. O teste de ELISA é realizado com proteínas da núcleo proteína "N" e da região RBD da spike do vírus, para confirmação da produção de títulos de IgG contra as duas proteínas testadas por infecção natural e vacina CoronaVac (reagente nas duas regiões) ou pela vacina AstraZeneca, Janssen & Johnson e Pfizer (reagentes apenas para RBD). Títulos neutralizantes com menos de 20 dias da primeira dose, podem significar uma infecção prévia, por SARS.CoV-2. O qPCR detecta fragmentos do gene E de Sars.Cov-2 em infectados.																																																																																														
 Prof. Dr. Edison Luiz Durigon Prof. Titular ICB II – USP	 Dra. Danielle B. L. Oliveira Pesquisadora ICB II-USP	São Paulo, 23 de agosto de 2022.																																																																																												
Nota: Este resultado é referente a participação no Projeto de Pesquisa "Resposta imune-humoral contra SARS.CoV-2 e suas variantes em vacinados, utilizando a técnica de neutralização viral -VNT e ELISA", o qual possui o objetivo de avaliar a resposta imune-humoral, titulando os valores de produção de anticorpos neutralizantes (NAbs) para determinar a porcentagem de vacinados produtores de anticorpos contra SARS.CoV-2. O trabalho é uma parte da tese de doutorado de Erika Donizetti de Oliveira Candido. E o número CEEA: 39339920.10000.5467.																																																																																														
Laboratório de Virologia Clínica e Molecular - LVCM Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas / USP																																																																																														

C. ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido 1

TCLE 1 preenchido pelos voluntários que participaram da pesquisa de anticorpos neutralizantes.

Avaliação da imunidade de anticorpos NEUTRALIZANTES para COVID - após Vacina

Pesquisa realizada pelo Laboratório de virologia clínica e molecular (LVCM) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-II) da USP.

favor enviar as informações extras como laudos de exames para Dra. Luciana Becker Mau, através do email: lubeckermau@gmail.com com o assunto: Projeto ICB

*Obrigatório

NESTE MOMENTO ESTAMOS RECRUTANDO ASTRAZENECA, CORONAVAC e JANSSEN.

por favor, se vc tomou PFIZER, não preencha este formulário. Não estamos mais recrutando vacinados por ela. Agora só coletaremos dos que já estão no projeto e preencheram o formulário, até o dia 18/08/21 e que tenham menos de 35 dias da primeira dose da Pfizer. Se você tomou as demais vacinas e tem menos de 15 dias (opcional) ou menos de 35 dias (obrigatório) da primeira dose, pode continuar e preencher o formulário. Mas se já passou de 35 dias da primeira dose, nos perdoo mas não podemos incluí-lo no estudo.

NÃO PROSSIGA SEM LER ESTA OBSERVAÇÃO

Por favor não preencha este formulário se vc não puder participar do estudo até o final. Os teste são caros, trabalhosos e requerem uma mão de obra especializada. Note que as coletas serão mensais e você terá que se deslocar até a Universidade de São Paulo, uma vez por mês por pelo menos 6 meses. obrigada!

1. Termo de Consentimento (TCLE) e Assentimento (TALE) Informado. Prezado(a) participante, *
Gostaríamos de te convidar para participar da pesquisa "Resposta Imune-humoral contra SARS.CoV-2 e suas variantes em vacinados, utilizando a técnica de neutralização viral -VNT e ELISA" com objetivo de acompanhar e avaliar a imunidade gerada pela vacinação contra SARS-COV-2 em vacinados e tempo de decaimento dos mesmos, além de avaliar a incidência de escape vacinal, através da técnica de PCR . Para isso, coletaremos amostras seriadas de sangue com as datas de 30, 60, 90, 120, 160 e 365 após a primeira dose da vacina como obrigatórios e mensalmente, como forma voluntária (para acompanhar os níveis de anticorpos) e Swab de Nasofaringe (SNF) e Orofaringe (SOF) para detectar sars.cov-2 em assintomáticos e sintomáticos vacinados. Sua participação nessa pesquisa é voluntária e caso você não aceite também não acarretará em nenhum prejuízo para você, podendo desistir a qualquer momento. Sua participação irá colaborar para o melhor entendimento sobre o comportamento do SARS-COV-2 na população vacinada. Caso aceite participar do estudo você ficará com uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. **INFORMAÇÕES SOBRE COVID-19:** Em dezembro de 2019, as autoridades de saúde de Wuhan, na China, identificaram um conjunto de casos de pneumonia de etiologia desconhecida ligada ao mercado de frutos do mar da China no sul da cidade. Investigações subsequentes revelaram um novo coronavírus, SARS-CoV-2, como agente causador agora no centro de um grande surto. (RCP). A nova doença de coronavírus 2019 (COVID-19) foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, após a identificação de 118.000 casos em 114 países. A síndrome gripal em adultos pode apresentar os seguintes sintomas: febre alta, calafrios, cefaléia, mialgia, artralgia, fadiga, anorexia e desconforto ocular (ardor, lacrimejamento e fotofobia). A duração dos sintomas sistêmicos é de aproximadamente 4 dias, enquanto os sintomas respiratórios, como tosse seca, congestão nasal e rinorréia podem durar até 14 dias nos casos de COVID-19. Os estudantes e profissionais de saúde ficam expostos, ao contato direto com pacientes que podem estar infectados com o vírus SARS-COV-2. Duração da Pesquisa: 12 meses. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A principal investigadora Danielle Bruna Oliveira pode ser encontrada na Av. Prof Lineu Prestes 1374, sala 225 Cidade universitária - ICB II, e-mail: danibruna.inovatech@gmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no mesmo endereço Desde já, agradecemos sua atenção e participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações. É garantido o direito de não aceitar participar, ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação pela decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a

participação. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os resultados individuais serão fornecidos mensalmente a cada um, via email.

Marcar apenas uma oval.

- Li e concordo com o termo
- Li e não concordo, não desejo participar

Dados pessoais

2. Número do Estudo (fornecido no momento da coleta)

3. Nome completo *

4. E-mail *

5. CPF (só número) *

6. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
- Masculino

7. Data de nascimento *

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

8. Peso em kg *

9. Altura em metro (ex. 1.60) *

10. Tem diagnóstico de doença crônica? (pode selecionar mais de 1 se necessário) *

Marque todas que se aplicam.

- Hipertensão Arterial
- Diabetes Mellitus
- Doença Cardiovascular
- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- Câncer em tratamento atual
- Imunossupressão
- Não possuo doença de base
- Outro: _____

Você já teve infecção pelo SARS-CoV-2?

11. Você já teve infecção pelo SARS-COV-2 *

Marcar apenas uma oval.

- Sim, confirmado por PCR
- Sim, confirmado por teste de antígeno
- Sim, Confirmado por sorologia
- Não, nunca tive covid *Pular para a pergunta 24*
- Suspeita, sem confirmação

12. Data dos primeiros sintomas

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

13. Sintomas (pode selecionar mais de 1)

Marque todas que se aplicam.

- Febre
- Perda de olfato/paladar
- Mialgia
- Tosse
- Coriza
- Dispnéia (falta de ar)
- Dor de garganta
- Cefaléia
- Diarréia
- Dor nas costas
- Manchas na pele
- Assintomático (nenhum sintoma)
- Não tive COVID
- Outro: _____

14. Se febre, por quantos dias?

15. Data do término dos sintomas

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

16. Realizou exame de imagem? Se sim, poderia compartilhar o laudo?

Marcar apenas uma oval.

- Não foi realizado exame de imagem
- Radiografia de torax
- Tomografia Computadorizada de Torax

17. Foi realizado exames laboratoriais como: Hemograma, PCR, D-Dímero, se sim envia-los a pessoa que mandou o formulário

Marcar apenas uma oval.

- SIM
- NÃO

Sobre gravidade do quadro

18. Ocorreu internação?

Marcar apenas uma oval.

- NÃO
- SIM

19. Quantos dias de internação?

20. Se necessitou de internação responda:

Marque todas que se aplicam.

- Internação em enfermaria
- Internação em unidade de terapia intensiva

21. Houve necessidade de suporte de oxigênio?

Marcar apenas uma oval.

- Não houve necessidade
- Cateter de O2
- Máscara não reinalante
- Intubação orotraqueal com necessidade de ventilação mecânica

Pular para a pergunta 22

Sobre o tratamento

22. Tratamento

Marcar apenas uma oval.

- Hidroxicloroquina
- Azitromicina
- Corticoides (Prednisona, Prednisolona, Dexametasona)
- Anticoagulante
- Apenas sintomáticos
- Nenhum
- Outro: _____

23. Caso resposta afirmativa na pergunta anterior, detalhar o medicamento e data de início e fim do tratamento

Pular para a pergunta 24

**Sobre
Vacina**

Se você foi vacinado com AstraZeneca ou CoronaVac e ainda não entrou no estudo, desculpe mas já finalizamos o recrutamento para estas duas vacinas. Mas se vc recebeu qualquer outra vacina ou se já está no projeto, você pode continuar. Se você não foi vacinado, nos desculpe, mas não temos como ajudá-lo.

24. Recebeu vacina? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não *Pular para a pergunta 34*

25. Qual vacina? *

Marcar apenas uma oval.

- Coronavac/Butantã
- Astra Zenica/Oxford
- Pfizer
- Janssen
- Sputnik
- Moderna

26. Data da 1a dose *

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

27. Lote da primeira dose *

28. Data da 2a dose

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

29. Lote da segunda dose

30. Apresentou algum efeito adverso?

Marque todas que se aplicam.

- Dor no local da aplicação
- Vermelhidão no local de aplicação
- Dor no corpo
- Febre
- Tosse
- Coriza
- Dor de cabeça
- Outro: _____

31. Apresentou sintomas de COVID-19 depois de vacinado? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

32. Se apresentou sintomas de COVID após vacinado, realizou rt-PCR *

Marcar apenas uma oval.

- Sim, com resultado positivo
- Sim, com resultado negativo
- Não realizei teste apesar dos sintomas
- Não tive sintomas

33. Você precisou de internação neste segundo evento? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não
- Não tive sintomas

Perguntas finais

Se você veio direto para esta seção, significa que você não foi convocado para o estudo. Nos desculpem.

34. Você se disponibilizaria para fazer coletas seriadas de anticorpos com menos de 15 dias e/ou 30, 60, 90, 120, 180 e 360 * dias após vacinação?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

35. Você coletaria uma amostra por mês durante 1 ano? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim, tudo pela Ciência.
- Não, 6 coletas é o meu máximo.

36. Confirmando a veracidade das informações acima concedidas *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

Favor realizar agendamento da coleta do exame, através do link abaixo. Não precisa de confirmação após o agendamento, basta comparecer no dia e horário escolhido. Obrigada pela participação!

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1gybD003hVTs5CJGZhS40N8mrFbwYt09_02w-ZXDCFXI/edit?usp=sharing

D. ANEXO D: Termo de consentimento livre e esclarecido 2

TCLE 2 preenchido pelos voluntários (profissionais da saúde) que participaram da pesquisa de anticorpos neutralizantes.

Avaliação da imunidade de anticorpos NEUTRALIZANTES para COVID em profissionais de saúde

Pesquisa realizada pelo Laboratório de virologia clínica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

favor enviar as informações extras como laudos de exames através do email: luciana.helman@hmj.irssl.email com o assunto: Projeto ICB

*Obrigatório

1. Termo de Consentimento (TCLE) e Assentimento (TALE) Informado. Profissionais de Saúde Prezado(a) participante, *
Gostaríamos de te convidar para participar da pesquisa "Diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e suas manifestações clínicas em profissionais de saúde e pacientes do Hospital Municipal Infantil Menino Jesus." com objetivo determinar a incidência da COVID-19 em pacientes e funcionários do Hospital Infantil Menino Jesus. Para isso, coletaremos amostras seriadas de sangue para acompanhar os níveis de anticorpos e faremos um swab nasofaríngeo para detectar o SARS-COV-2 para que seja realizado um teste de RT-PCR sempre que apresentar sintomas. Logo após, realizaremos um questionário com você, via via Google Forms, incluindo dados demográficos, histórico de infecção prévia e atual. Sua participação nessa pesquisa é voluntária e caso você não aceite também não acarretará em nenhum prejuízo para você, podendo desistir a qualquer momento. Sua participação irá colaborar para o melhor entendimento sobre o comportamento do SARS-COV-2 entre Profissionais de Saúde e suas implicações no controle de transmissão do vírus intra e Inter hospitalar. Caso aceite participar do estudo você ficará com uma cópia deste Termo de Consentimento.
INFORMAÇÕES SOBRE COVID-19 Em dezembro de 2019, as autoridades de saúde de Wuhan, na China, identificaram um conjunto de casos de pneumonia de etiologia desconhecida ligada ao mercado de frutos do mar da China no sul da cidade. Investigações subsequentes revelaram um novo coronavírus, SARS-CoV-2, como agente causador agora no centro de um grande surto. (RCP). A nova doença de coronavírus 2019 (COVID-19) foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, após a identificação de 118.000 casos em 114 países. A síndrome gripal em adultos pode apresentar os seguintes sintomas: febre alta, calafrios, cefaléia, mialgia, artralgia, fadiga, anorexia e desconforto ocular (ardor, lacrimejamento e fotofobia). A duração dos sintomas sistêmicos é de aproximadamente 4 dias, enquanto os sintomas respiratórios, como tosse seca, congestão nasal e rinorréia podem durar até 14 dias nos casos de COVID-19. Os estudantes e profissionais de saúde ficam expostos, ao contato direto com pacientes que podem estar infectados com o vírus SARS-COV-2. Duração da Pesquisa: 12 meses. Em qualquer etapa do estudo, o você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A principal investigadora Luciana Becker Mau Helman pode ser encontrada na Rua dos Franceses, 250 – Bela Vista, São Paulo - SP, 01329-010– tel: (11)3016-0513, e-mail: luciana.helman@hmj.irssl.email. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua dos Franceses, 250 – Bela Vista, São Paulo - SP, 01329-010– tel: (11)3016-0500 – E-mail: eticaepesquisa@hmj.irssl.email. Desde já, agradecemos sua atenção e participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações. É garantido o direito de não aceitar participar, ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação pela decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações

científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Marcar apenas uma oval.

- Li e concordo em participar desta pesquisa
- Não concordo em participar desta pesquisa

Dados pessoais

2. Nome completo *

3. E-mail

4. CPF (só número) *

5. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
- Masculino

6. Cargo *

Marcar apenas uma oval.

- Enfermeiro (a)
- Técnico/Auxiliar de enfermagem
- Médico
- Auxiliar/assistente/analista administrativo
- Fisioterapeuta
- Fono/TO/Nutri
- Coordenador (a)/supervisor (a)
- Farmacêutico/Auxiliar de farmácia
- Auxiliar de limpeza
- Controlador de acesso/ascensorista
- Outro: _____

7. Andar de trabalho *

Marcar apenas uma oval.

- Terréo
- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10

8. Data de nascimento *

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

9. Peso em kg *

10. Altura em metro (ex. 1,60) *

11. Tem diagnóstico de doença crônica? (pode selecionar mais de 1 se necessário) *

Marque todas que se aplicam.

- Hipertensão Arterial
- Diabetes Mellitus
- Doença Cardiovascular
- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- Câncer em tratamento atual
- Imunossupresão
- Não possuo doença de base
- Outro: _____

Sobre a infecção pelo SARS-CoV-2

12. Diagnóstico confirmado com rt-PCR por qual laboratório? *

Marcar apenas uma oval.

- ICB
- Mendelics
- Outros
- Não tive COVID-19
- Outro: _____

13. Data dos primeiros sintomas

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

14. Sintomas (pode selecionar mais de 1)

Marque todas que se aplicam.

- Febre
- Perda de olfato/paladar
- Mialgia
- Tosse
- Coriza
- Dispnéia (falta de ar)
- Dor de garganta
- Cefaléia
- Diarréia
- Dor nas costas
- Manchas na pele
- Assintomático (nenhum sintoma)
- Outro: _____

15. Se febre, por quantos dias?

16. Data do término dos sintomas

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

17. Realizou exame de imagem? Se sim, poderia compartilhar o laudo?

Marcar apenas uma oval.

- Não foi realizado exame de imagem
 Radiografia de torax
 Tomografia Computadorizada de Torax

18. Foi realizado exames laboratoriais como: Hemograma, PCR, D-Dímero, se sim envia-los a pessoa que mandou o formulário

Marcar apenas uma oval.

- SIM
 NÃO

Sobre gravidade do quadro

19. Ocorreu internação?

Marcar apenas uma oval.

- NÃO
 SIM

20. Quantos dias de internação?

21. Se necessitou de internação responda:

Marque todas que se aplicam.

- Internação em enfermaria
 Internação em unidade de terapia intensiva

22. Houve necessidade de suporte de oxigênio?

Marcar apenas uma oval.

- Não houve necessidade
 Cateter de O2
 Máscara não reinalante
 Intubação orotraqueal com necessidade de ventilação mecânica

Pular para a pergunta 23

Sobre o tratamento

23. Tratamento

Marcar apenas uma oval.

- Hidroxicloroquina
- Azitromicina
- Corticoides (Prednisona, Prednisolona, Dexametasona)
- Anticoagulante
- Apenas sintomáticos
- Nenhum
- Outro: _____

24. Caso resposta afirmativa na pergunta anterior, detalhar o medicamento e data de início e fim do tratamento

Pular para a pergunta 25

Sobre Vacina

25. Recebeu vacina? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

26. Qual vacina?

Marcar apenas uma oval.

- Butantã
- Astra Zenica/Oxford

27. Data da 1a dose *

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

28. Data da 2a dose

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

29. Apresentou algum efeito adverso?

Marque todas que se aplicam.

- Dor no local da aplicação
- Vermelhidão no local de aplicação
- Dor no corpo
- Febre
- Tosse
- Coriza
- Dor de cabeça
- Outro: _____

30. Apresentou sintomas de COVID-19 depois de vacinado?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

31. Se apresentou sintomas de COVID após vacinado, realizou rt-PCR

Marcar apenas uma oval.

- Sim, com resultado positivo
- Sim, com resultado negativo
- Não realizei teste apesar dos sintomas

32. Você precisou de internação neste segundo evento?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

33. Algo que não perguntamos que julga relevante?

34. Você se disponibilizaria para coletar uma sorologia para SARS-CoV-2 para acompanharmos a produção de anticorpos após a resolução da doença?

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não




35. Confirmando a veracidade das informações acima concedidas *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

E. ANEXO E: Ficha de coleta

Ficha de coleta de sangue preenchida pelos voluntários a cada coleta realizada para a pesquisa de anticorpos neutralizantes.

	 DEPARTAMENTO DE MICROBiologia UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP: 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil fone: 55 11 - 3091.7293 e-mail: eldurigo@usp.br		
PROJETO "Resposta Imune-humoral contra Sars.Cov-2 e suas variantes em vacinados, utilizando a técnica de ELISA e neutralização viral -VNT"		
Etiqueta ou número da primeira coleta		
<input type="text"/>		
data da Coleta: ___ / ___ / ___		
Nome: <input type="text"/>		
OBS: A data com os resultados de Elisa e VNT, devem variar entre 30-45. Em caso de dúvida ou sintomas de gripe, durante o período de estudo, entrar em contato pelo email danibruna.inovatech@gmail.com ou pelo Whatsapp 11-976956559.		
esta via é do participante		Obrigada por participar!

PROJETO "Resposta Imune-humoral contra Sars.Cov-2 e suas variantes em vacinados, utilizando a técnica de ELISA e neutralização viral -VNT"		
Etiqueta ou número da primeira coleta		
<input type="text" value="HIMJ"/>		
data da coleta: ___ / ___ / ___		
#Nome: <input type="text"/>		
# - obrigatório		
#CPF: <input type="text"/>	Tel: <input type="text"/>	
# - obrigatório		
Email: <input type="text"/>		
Diagnóstico de COVID confirmado por teste entre a última coleta e hoje?: () SIM () Não		
Data: ___ / ___ / ___ # - obrigatório		
VACINA: () CORONAVAC () ASTRAZENECA () PFIZER () JANSSEN JOHNSON		
Data: 1º dose: ___ / ___ / ___ Lote*: _____		
Data: 2º dose: ___ / ___ / ___ Lote*: _____		
Data: 3º dose: ___ / ___ / ___ Lote*: _____		
		esta via do laboratório
Reações adversas a vacina: colocar em qual dose entre parênteses (1º) (2º) (3º) () cefaléia; () dor local; () exantema; () diarreia;		
Outros: _____		
<hr/> Laboratório de Virologia Clínica e Molecular - LVCM Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas / USP		