

Imunidade na Infecção pelo SARS-CoV-2: O que Sabemos

SARS-CoV-2 Immune Response: An Overview

Cláudio Nunes Silva¹ (<http://orcid.org/0000-0002-4694-1362>), Filipa Ceia¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8382-750X>), Margarida Tavares^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0003-4518-2197>)

Resumo:

Sobre a pandemia provocada pelo SARS-CoV-2, muito conhecimento tem sido produzido e dado a conhecer, mas muitas dúvidas permanecem por esclarecer acerca da sua interação com o ser humano, nomeadamente sobre se a resposta imune contra este novo coronavírus humano é protetora a longo prazo e qual a possibilidade de re-infecção. A COVID-19 pode assumir diferentes espectros clínicos, desde infeções assintomáticas até formas graves da doença, que resultam da inter-relação entre a patogenicidade própria do vírus e a resposta imune do hospedeiro. Esta revisão foca-se na imunologia da infeção, reunindo não só o conhecimento acumulado com as epidemias associadas ao SARS-CoV e MERS-CoV, mas também o que já se sabe sobre o SARS-CoV-2. Este conhecimento é fundamental e tem implicações quer para o controlo e prevenção da doença quer para o seu diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: Anticorpos Neutralizantes; Betacoronavírus; COVID-19; Imunidade Celular; Infeções por Coronavírus/imunologia; Pandemia

Abstract:

Despite all that is recognized so far on the ongoing SARS-CoV-2 pandemic, many questions remain to be answered, particularly in what concerns pathogen interaction with the human host and whether or not the acquired immune response is protective against re-infection in the long-term. The spectrum of COVID-19 ranges from asymptomatic infections to progressive critical states, a direct upshot from the complex interplay between virus pathogenicity and host antiviral defense. This review focuses on the immunologic response and disarrangements underlying the SARS-CoV-2 pathophysiology, gathering the information not only from the lessons learnt from SARS and MERS-CoV epidemics but also from what is already known about SARS-CoV-2 to date. This knowledge is paramount from the standpoint of disease prevention and control as well as diagnostic pipeline and treatment.

¹Unidade de Doenças Infeciosas Emergentes, Serviço de Doenças Infeciosas, Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto, Portugal

²EPIUnit, Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<https://revista.spmi.pt> – DOI: 10.24950/rspmi/ COVID19/CHUSJ/S/2020

Keywords: Antibodies, Neutralizing; Betacoronavirus; Coronavirus Infections/immunology; COVID-19; Immunity, Cellular; Pandemics; Betacoronavirus; Immunology; Cell-mediated Immunity, Humoral Immune Response; Innate Immunity; Neutralizing Antibodies.

Introdução

Nos primeiros quatro meses deste ano, quase todos os países do mundo enfrentaram uma doença vírica emergente, a COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), com consequências sanitárias, sociais e económicas sem precedentes na era moderna. A COVID-19 é uma doença causada por um novo coronavírus, agora designado como *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), que foi inicialmente identificado como causa de um surto de infeções respiratórias agudas em Wuhan, na província de Hubei, China.^{1,2} Depois do primeiro alerta sobre esta emergência infecciosa ter sido dado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 31 de dezembro de 2019,³ em 30 de janeiro de 2020 esta declarou-a como uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional.⁴ Finalmente, em 11 de março de 2020, quando já tinham sido confirmados mais de 118 000 casos em 114 países, e com 4291 mortes associadas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma pandemia global para intensificar as ações de controlo e prevenção no mundo.⁵

Este novo coronavírus é um vírus de ARN simples de sentido positivo, e o sétimo coronavírus identificado como causa de doença humana. A sua origem é zoonótica, embora a fonte da infeção seja ainda desconhecida e continuem a ser investigados os reservatórios e hospedeiros. Duas outras espécies de coronavírus com quem partilha muitas semelhanças, SARS-CoV e MERS-CoV, foram também previamente reconhecidos como vírus emergentes com origem em reservatórios animais, e causa de surtos de infeções respiratórias em humanos em 2003 e 2012, respetivamente. O tropismo que as proteínas de superfície (S) destas últimas espécies apresentam para receptores presentes no trato respiratório inferior justifica a apresentação na forma de pneumonia vírica potencialmente grave.⁶⁻⁸

Durante este período de contacto e vivência intensa e global com este novo coronavírus, muito conhecimento tem sido produzido e dado a conhecer, mas muitas dúvidas permanecem por esclarecer acerca de sua interação com o ser humano, nomeadamente a sua fisiopatologia e as implicações

na história natural, e características a curto e médio prazo da doença que provoca. Clinicamente, cerca de 81% dos doentes infetados apenas apresenta sintomas ligeiros, 14% sinais e sintomas mais graves (dispneia, taquipneia e hipoxemia) e 5%, especialmente aqueles com idade superior a 60 anos ou com comorbilidades, progridem para formas críticas da doença, com ARDS, sépsis e/ou falência multiorgânica.⁹ Estes diferentes espectros de uma mesma doença resultam da combinação da patogenicidade do vírus e da resposta imunológica do hospedeiro.¹⁰ Esta revisão foca-se na imunologia da infeção, reunindo o conhecimento acumulado relativamente aos coronavírus, e sobretudo no que se aprendeu com as epidemias associadas ao SARS-CoV e MERS-CoV. Muito do que já sabemos decorre também da produção e disseminação intensa da experiência com esta nova infeção em muitos países do mundo. Pretende-se assim fazer um ponto de situação sobre o que já se sabe sobre a resposta imunológica à infeção por SARS-CoV-2, conhecimento essencial para a tomada de decisões individuais e populacionais no tratamento e controlo desta doença infecciosa emergente.

UM BRAÇO DE FERRO ENTRE O VÍRUS E A IMUNIDADE INATA DO HOSPEDEIRO: DA RESPOSTA DO INTERFERÃO À CRISE DE CITOCINAS

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo. Durante uma infeção vírica, pode atuar inibindo a replicação vírica e promovendo a clearance viral, e funciona como desencadeador da resposta imune adaptativa.¹¹

Os vírus são reconhecidos pelo sistema imune (SI) através de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) que identificam padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs). Existem diferentes tipos de PRRs que induzem respostas diferentes consoante a via de sinalização ativada. Alguns PRRs como os *toll-like receptors* (TLRs), os *RIG-I-like receptor* (RLR) e os *nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors* (NLR), quando expostos à ameaça por um vírus, promovem a síntese de interferão (IFN) do tipo I. A ativação da via do IFN limita a replicação vírica e induz a resistência de células não infetadas à infeção. Assim, alguns vírus como o SARS-CoV, embora sensíveis ao IFN, apresentam mecanismos de evasão à resposta antivírica do hospedeiro mediada pelo interferão. No caso do SARS-CoV, esta propriedade de evasão está associada à proteína da nucleocápside (N).¹¹ Num estudo laboratorial realizado na Universidade do Texas, os investigadores compararam a replicação vírica do SARS-CoV e do SARS-CoV-2 em cultura de células Vero pré-tratada com IFN-I (IFN- α). Os resultados mostraram uma redução significativa do título viral na cultura de SARS-CoV-2 pré-tratada com IFN-I quando comparado com a cultura isenta de IFN-I, e que esta redução não se verificou na cultura pré-tratada de SARS-CoV. Adicionalmente, avaliando a produção de proteínas, os investigadores constataram um défice de proteína N na cultura de SARS-CoV-2 pré-tratada com IFN-I. Os autores concluem

que a sensibilidade do SARS-CoV-2 ao IFN-I é diferente da previamente descrita para o SARS-CoV, sugerindo que o novo coronavírus tenha interações diferentes com o hospedeiro que poderão determinar resultados clínicos distintos.¹²

Tay M *et al* explicam o fenómeno a que chamamos crise de citocinas ou síndrome de libertação de citocinas. A replicação ativa do SARS-CoV-2 e a sua libertação causam a piroptose das células hospedeiras infetadas e a consequente libertação de moléculas associadas a dano. Estas moléculas são reconhecidas como sinais de perigo por células epiteliais, endoteliais e pelos macrófagos alveolares, levando à produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-10, IFN γ , MIP 1 α e 1 β , MCP1, IP-10). Estas proteínas recrutam leucócitos (predominantemente células T e monócitos) ao local de infeção. Na maioria dos doentes, as células recrutadas eliminam a infeção e a resposta imune recua de forma controlada. No entanto, em alguns casos, este recrutamento celular resulta em infiltração pulmonar por células do SI, desencadeando a produção exagerada de citocinas pro-inflamatórias e a consequente lesão pulmonar, bem como disfunção multiorgânica pelos efeitos sistémicos destas proteínas.¹³ Liao M *et al* caracterizaram a população leucocitária broncoalveolar em doentes com COVID-19 e encontraram um predomínio de macrófagos derivados de monócitos (FCN1+), com capacidade fortemente pro-inflamatória e de produção de quimiocinas nos doentes graves, potencialmente desencadeadores de crise de citocinas, contrariamente aos doentes com formas ligeiras, nos quais predominam macrófagos alveolares (FABP4+).¹⁴

Vários estudos foram demonstrando a importância das citocinas na COVID-19. Num estudo realizado no Hospital Jin Yintan (Wuhan, China), indivíduos com doença grave apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP1, MIP1 α e TNF α .¹⁵ Um outro estudo de Liu J *et al*, mostrou que a concentração sérica de IL-6, IL-10, IL-2 e IFN- γ era maior nos doentes graves do que nos ligeiros, e que esse aumento era sustentado no tempo para a IL-6 e a IL-10. Nos doentes graves, a diminuição da IL-6 foi mais tardia, ocorrendo a partir do 16º dia de sintomas.¹⁶ Zhou F *et al* evidenciaram que em doentes graves os níveis de IL-6 continuam a aumentar com o tempo e são relativamente mais elevados em não sobreviventes do que em sobreviventes.¹⁷ No entanto, num estudo de Zheng HY *et al*, que incluiu 16 doentes com COVID-19, 10 com formas ligeiras e 6 com formas graves de doença, não foram encontradas diferenças nos níveis plasmáticos de IL-6 entre grupos, nem em comparação com controlos saudáveis.¹⁸ Numa análise do transcriptoma de 3 doentes levada a cabo por Ong EZ *et al*, a expressão de genes inflamatórios teve o seu pico após o *nadir* da função respiratória, exceto para a via da IL-1, na qual precedeu o *nadir* da função respiratória, o que, segundo os autores, pode levantar a possibilidade de a IL-1 e as vias pro-inflamatórias relacionadas poderem ter valor prognóstico na COVID-19.¹⁹

Assim, até ao momento, a evidência tem demonstrado que a crise de citocinas se associa a gravidade na COVID-19 e muitas estratégias de tratamento em estudo têm como alvo terapêutico citocinas e quimiocinas.

IMUNIDADE ADAPTATIVA, UMA SINFONIA COMPLEXA: DA BATUTA DA IMUNIDADE CELULAR AO ENCORE DA IMUNIDADE HUMORAL

A imunidade adaptativa caracteriza-se pela especificidade e memória da resposta imune. As células T têm um papel antivírico importante, particularmente os linfócitos T CD4+ e T CD8+.¹¹ As células T CD8+ têm função citotóxica direta contra células infetadas pelo vírus, enquanto as células T CD4+ são cruciais na estimulação da imunidade mediada por anticorpos, na preparação de células T CD8+ e na produção de citocinas.¹³ Outro tipo de células importantes são as células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), presentes nos tecidos infetados, que funcionam como ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida, uma vez que são responsáveis por apresentar peptídeos víricos aos linfócitos.¹¹ Na infeção por SARS-CoV, uma vez ativadas, os linfócitos T CD4+ expressam IFN γ , TNF α e IL-2, sugerindo uma resposta do tipo Th1, ou seja, mediada por células.¹³ Usando o modelo de SARS-CoV, todas as células T de memória são dirigidas contra proteínas estruturais do vírus e existe alguma evidência de que a resposta mediada por células T às proteínas S, M e N é duradoura e persistente.¹¹ No entanto, no que se refere à infeção por SARS-CoV-2 pouco se sabe quanto à especificidade e à duração da imunidade mediada por células T.

A linfopenia está presente numa grande proporção de doentes com COVID-19 e é habitualmente mais acentuada nas formas graves de doença.^{16,20-22} Estes doentes apresentam um rácio entre neutrófilos e linfócitos aumentado, sendo que o rácio entre neutrófilos e linfócitos T CD8+ foi identificado como um fator de prognóstico poderoso na COVID-19 grave.¹⁶ Tay M *et al* apontam a destruição direta dos linfócitos pelo vírus e a migração de linfócitos para o local de infeção como potenciais causas para esta linfopenia.¹³ Num estudo que incluiu 40 doentes, Liu J *et al* descrevem que a recuperação da linfopenia nos doentes graves ocorre gradualmente a partir dos 7-15 dias de sintomas e acalça níveis comparáveis aos doentes ligeiros a partir do 16º dia de sintomas.¹⁶

As subpopulações linfocitárias no sangue periférico foram caracterizadas em vários estudos. Wang F *et al* estudaram 60 doentes internados com COVID-19, tendo descrito uma contagem diminuída de células T CD4+, T CD8+, B e NK. No caso dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e B, estas contagens eram mais baixas nos doentes mais graves.²⁰ Num outro estudo que incluiu 68 doentes com COVID-19 e gravidade variável, a contagem de linfócitos, particularmente de linfócitos T CD8+, foi menor nos doentes que nos controlos saudáveis, e foi menor nos casos graves relativamente aos ligeiros.²³ Liu J *et al*

também verificaram descida sustentada de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos doentes graves quando comparados com doentes ligeiros.¹⁶ Wang F *et al* mostraram que parece existir uma correlação negativa entre a contagem de linfócitos T CD8+ e o estado inflamatório e uma correlação positiva entre este estado e a razão CD4 +/ CD8 + na COVID-19.²⁰

Num estudo de caracterização do microambiente imune do lavado broncoalveolar em doentes com COVID-19, a proporção de células T e NK foi significativamente maior em doentes do que em controlos saudáveis e a proporção de linfócitos T CD8+ menor em doentes graves. A maior proporção de células T CD8+, com expansão clonal, em doentes ligeiros indicia que estas células têm um papel importante na *clearance* viral e que a resposta é específica para o SARS-CoV-2, sugerindo uma resposta imune adaptativa mais robusta.¹⁴

Na COVID-19, a exaustão de células T e a redução da sua diversidade funcional prediz doença grave.¹³ O estudo de Zheng HY *et al* incluiu 16 doentes com COVID-19 (10 graves e 6 ligeiros) em comparação com controlos saudáveis, com o objetivo de avaliar a exaustão e a funcionalidade de linfócitos T na COVID-19. Os autores descrevem que moléculas relacionadas com a ativação e regulação de células T estão aumentadas em doentes face aos controlos, enquanto as relacionadas com a função estão diminuídas nos doentes graves face aos ligeiros. Os níveis de enzimas indutoras de apoptose de células alvo nos linfócitos T CD8+ foi superior nos doentes graves, assim como os seus níveis de moléculas reguladoras.¹⁸ Neste estudo, face aos controlos saudáveis e aos doentes ligeiros, a frequência de linfócitos T CD4+ multifuncionais (positivos para pelo menos duas citocinas) foi significativamente menor no grupo de doentes graves, enquanto a proporção de células não-funcionais (caracterizadas pela ausência de expressão de IFN γ , TNF α e IL-2) foi superior. Nos linfócitos T CD8+, a frequência de células não-exaustas (que não expressam PD-1, CTLA-4 e TIGIT) foi menor na doença grave. Sendo o bloqueio funcional de PD-1, CTLA-4 e TIGIT benéfico para os linfócitos T CD8+ manterem imunidade antígeno-específica duradoura e os seus efeitos antivíricos, a exaustão excessiva das células T CD8+ na doença grave pode comprometer a resposta celular ao SARS-CoV-2. Os autores identificaram a perda da diversidade funcional dos linfócitos T CD4+ e o aumento da expressão de moléculas reguladoras nos linfócitos T CD8+ como fatores imunológicos distintivos de gravidade da COVID-19.¹⁸ Zheng M *et al* estudaram 68 doentes, 13 dos quais graves, usando a expressão de NKG2A como marcador de exaustão das células NK e dos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Verificaram que na COVID-19, na admissão hospitalar, a expressão de NKG2A está significativamente aumentada face aos controlos saudáveis, e que, na fase de convalescença, a contagem de linfócitos T CD8+ aumenta e a percentagem de linfócitos T CD8+ NKG2A+ diminui. Os autores concluem que a expressão de NKG2A se relaciona com a exaustão funcional dos linfócitos citotóxicos e com a progressão da doença numa fase precoce da infeção.²³

IMUNIDADE HUMORAL: DA DINÂMICA DA RESPOSTA HUMORAL APÓS A INFEÇÃO POR SARS-COV-2 AO POTENCIAL DE REINFEÇÃO

Estudos em pré-publicação ou publicados recentemente têm permitido uma compreensão crescente sobre a dinâmica da resposta humoral após a infeção por SARS-CoV-2, sugerindo até que esta possa ser semelhante à das infeções pelo SARS-CoV e MERS-CoV. A maioria dos doentes com infeção confirmada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) apresentam seroconversão entre o 10º e o 14º dia após o início de sintomas. No entanto, os dados sobre se estes anticorpos conferem proteção contra nova infeção e qual a sua duração são atualmente limitados e, em parte, baseados naquilo que se sabe sobre a SARS.²⁴⁻²⁹

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

Os métodos de referência para a deteção de anticorpos contra determinado vírus são os testes de neutralização, que medem a capacidade dos anticorpos presentes numa amostra de soro de impedirem a infeção de células suscetíveis por uma carga padronizada de vírus. No entanto, devido à manipulação de vírus altamente patogénicos, o seu uso implica a existência de condições de biossegurança de nível 3. Uma das alternativas envolve a utilização de partículas virais pseudotipadas com o antigénio recombinante de interesse, como a proteína S do vírus SARS-CoV-2, e cujo genoma codifica uma enzima reportadora, de que é exemplo a luciferase. As células suscetíveis (i.e., que expressam o recetor para a proteína S) e que são “infetadas” pelo pseudovírus incorporam esta enzima no seu genoma, sendo a sua expressão proporcional ao número de células transduzidas. Uma vez que são utilizados pseudovírus, estes ensaios de neutralização podem ser feitos em laboratórios de biossegurança de nível 2. A atividade neutralizante é medida como a dose inibitória a 50% (ID50), ou seja, a diluição mais alta de plasma contendo anticorpos contra SARS-CoV-2 responsável por uma redução em 50% da luminescência da enzima luciferase em comparação com o controlo.³⁰

Os testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) e os testes imunocromatográficos de fluxo lateral permitem a deteção de anticorpos presentes contra determinado antigénio. Enquanto que os primeiros permitem medir o título de anticorpos presentes, os segundos são meramente qualitativos. Nenhum dos dois permite saber se os anticorpos presentes são protetores, ou seja, não medem a sua atividade neutralizante.^{31,32}

De entre as 4 proteínas estruturais dos coronavírus, as proteínas M (membrana) e E (envelope) são necessárias na montagem das partículas virais. A proteína S pode ser clivada por proteases do tipo furina nos polipeptídeos S1 e S2. O

subdomínio S1 é importante na adesão ao recetor das células hospedeiras, através da interação do seu domínio de ligação ao recetor (RBD) ao recetor da enzima de conversão da angiotensina II (ECA2). Já o S2, o subdomínio da proteína S mais conservado entre os diferentes coronavírus, é responsável pela fusão com a célula hospedeira. A proteína N (nucleocápside) está envolvida nos processos de transcrição e replicação do ARN viral e na encapsidação do genoma em viriões.³³ As proteínas estruturais mais imunogénicas são a S e a N, pelo que os antigénios atualmente utilizados nos testes serológicos se baseiam em proteínas recombinantes N e S, no subdomínio N-terminal S1 (S1) ou na RBD da proteína S. As respostas neutralizantes são dirigidas contra a proteína S.³⁴

Dinâmica da resposta humoral

Através de ensaios ELISA baseados na deteção de anticorpos contra a proteína recombinante da nucleocápside, Guo *et al* analisaram a cinética da resposta humoral IgA, IgM e IgG num total de 208 amostras de plasma de 82 casos confirmados e 58 prováveis de COVID-19. O tempo mediano até deteção das diferentes classes de anticorpos foi de 5 dias (âmbito interquartil 3-6) para a IgA e IgM, e de 14 dias (âmbito interquartil 10-18) para a IgG. As taxas de deteção foram de 92,7% e 85,4%, respetivamente, para a IgA e IgM nas amostras colhidas < 7 dias após o início de sintomas, e de 77,9% para a IgG em todas as amostras colhidas no estudo. O título de anticorpos IgA aumentou entre os dias 0-7 (título geométrico médio [GMT], 400) e os dias 8-14 (GMT, 597,24, $p = ,000$), sem aumento estatisticamente significativo subsequente. Esta dinâmica foi semelhante à observada para os anticorpos da classe IgM, enquanto que para os da classe IgG se verificou um aumento estatisticamente significativo desde os dias 0-7 (GMT, 490,45) até aos dias 15-21 (GMT, 2690,87, $p = ,000$), com um *plateau* subsequente.²⁵

Um estudo realizado no hospital de Shenzhen, na China, utilizou 3 ensaios serológicos diferentes para analisar a seroconversão em 535 amostras de 173 doentes com COVID-19: dois visando a determinação de anticorpos totais e da classe IgM contra a RBD da proteína S, e um outro para a determinação de anticorpos IgG contra a proteína N. Quando considerada a totalidade dos doentes, a taxa de deteção de anticorpos totais foi de 93,1%, com tempo mediano até seroconversão de 11 dias. Para a classe IgM, esta foi de 82,7%, com tempo mediano até seroconversão de 12 dias. Já a taxa de seroconversão IgG foi mais baixa (64,7%) e mais lenta (14 dias). Quando os doentes foram categorizados de acordo com o tempo após início de sintomas em que as amostras de plasma foram colhidas, verificou-se que a taxa de seroconversão foi < 40% para os diferentes ensaios na primeira semana, aumentando para 100% (anticorpos totais), 94,3% (IgM) e 79,8% (IgG) nos doentes cujas amostras foram colhidas a partir do dia 15.²⁴

Estes dados são também sustentados por um outro estudo, que pretendia comparar dois testes ELISA baseados nas

proteínas recombinantes S e N de SARS-CoV-2 em 214 doentes categorizados em 7 grupos de acordo com o momento de colheita das amostras de plasma: a taxa de seroconversão foi de 30%-50% nos primeiros 10 dias de doença, aumentando para os 88,9%-90,7% entre os dias 11-15. A taxa de deteção de anticorpos da classe IgM diminuiu a partir dos 35 dias após o início de sintomas.²⁷

Assim, a dinâmica da resposta humoral parece seguir uma sequência bem definida, com anticorpos da classe IgA e IgM a aparecerem primeiro após a infeção primária e os da classe IgG mais tardiamente. À semelhança do SARS,³⁵ a cinética da resposta humoral na COVID-19 inicia-se por volta do quinto, sexto dia de doença. O anticorpo da classe IgM é detetável, na maioria dos casos, entre o sétimo e o 10º dia e o da classe IgG entre o 10º e o 20º dia. No geral, a sensibilidade da serologia é baixa nos primeiros dias e pode aumentar para ≥ 70% após o 10º dia de doença.

No que diz respeito à relação entre o título de anticorpos e a gravidade da doença, Zhao J *et al* demonstraram que, a partir das 2 semanas após início de sintomas, os títulos de anticorpos foram estatisticamente superiores nos doentes críticos quando comparados com não críticos.²⁴ Numa outra coorte de 285 doentes, em que 39 foram classificados como tendo infeção grave ou crítica, todos os doentes apresentavam seroconversão aos 17-19 dias de doença. Nas amostras colhidas entre os dias 7-14 de doença, o título de IgG foi significativamente mais alto naqueles com infeção grave, desaparecendo, no entanto, esta diferença nas amostras colhidas a partir do dia 15.³⁶ Num estudo de colaboração europeu, Okba N *et al* apontam que, em 3 doentes com amostras de plasma colhidas longitudinalmente, a seroconversão foi mais precoce e os títulos de anticorpos mais elevados num doente grave comparativamente aos outros 2 doentes ligeiros, tal como já observado previamente para doentes com MERS.²⁸ Também Wu F *et al* mostram uma correlação moderada entre o nível de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2, a idade do doente e os níveis de proteína C reativa, e uma correlação negativa

com a contagem de linfócitos.³⁷ No entanto, permanece por esclarecer esta relação entre a gravidade da doença e o título de anticorpos em coortes maiores compostas por indivíduos com diferentes graus de gravidade de doença, dado que existe pelo menos um outro estudo em Hong Kong, envolvendo 10 doentes graves e 13 ligeiros, onde tal não foi evidente.²⁶

Reatividade cruzada com outros coronavírus

Nos estudos de Guo Li *et al* e Okba N *et al* verificou-se, em ensaios ELISA e por técnica de *Western-blot*, reatividade cruzada entre as proteínas recombinantes S1, S2, RBD e N de SARS-CoV e SARS-CoV-2, mas não com as de outros coronavírus (MERS-CoV, HKU1, OC43, NL63 e 229E). Este facto não é surpreendente uma vez que os vírus SARS-CoV-2 e SARS-CoV apresentam uma homologia de cerca de 77,2% e 90,5% nos aminoácidos que compõem a proteína S e N, respetivamente. Este grau de homologia é bem inferior no caso de outros coronavírus (Tabela 1). No entanto, o vírus SARS-CoV não circula na população humana desde 2003 e, tal como explicado mais abaixo, é altamente improvável que estejam atualmente presentes anticorpos contra esse vírus na população, pelo que não é exetável falsos positivos nas reações serológicas para SARS-CoV-2 provocados por outros coronavírus.^{25,28}

Num estudo de Wu F *et al*, apesar da ligação dos anticorpos presentes no plasma de doentes COVID-19 às proteínas recombinantes S1 e RBD de SARS-CoV em testes de imunabsorção enzimática, estes não conseguiram inibir a infeção por pseudovírus de SARS-CoV em ensaios de neutralização *in vitro*, indicando que os epitopos responsáveis pela neutralização possam não estar conservados entre estes dois vírus e explicando o porquê do uso de plasma convalescente de doentes recuperados da SARS poder não ser eficaz em doentes COVID-19.³⁷ Estes dados são apoiados por outros estudos: baseado em análises estruturais, Yuan *et al* determinaram que um anticorpo monoclonal humanizado contra a proteína S de SARS-CoV (CR3022) apresentava ligação cruzada a um

Tabela 1: Percentagem de homologia dos aminoácidos que compõem as proteínas S e da nucleocápside de diferentes coronavírus relativamente às do SARS-CoV-2

		N	S	S1	S2	RBD
Beta-CoV	SARS-CoV	90	77	66	90	73
	MERS-CoV	49	33	24	43	nd
	HCoV-OC43	34	33	25	42	nd
	HCoV-HKU1	34	32	25	40	nd
Alpha-CoV	HCoV-229E	28	30	24	35	nd
	HCoV-NL63	29	28	21	36	nd

N – nucleocápsise, S – proteína espigão (*spike*), S1 – subunidade S1 da proteína S, S2 – subunidade S2 da proteína S, RBD – domínio de ligação ao recetor da subunidade S1, nd – não realizado
Adaptado de Okba NM *et al*. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020 (in press).²⁸

epítopo altamente conservado próximo da RBD de SARS-CoV-2, sem, no entanto, conferir atividade neutralizante em ensaios *in vitro*.³⁸ Também Ou *et al*, usando anticorpos policlonais (T62) contra a proteína S1 de SARS-CoV, provaram que estes conseguiam inibir a entrada de pseudovírus de SARS-CoV em células suscetíveis mas não de SARS-CoV-2.³⁹

Será a imunidade humoral contra SARS-CoV-2 protetora?

Têm surgido vários estudos que pretendem avaliar se os anticorpos dos doentes recuperados têm atividade neutralizante. Os anticorpos neutralizantes (NAbs) específicos para determinado vírus têm a capacidade de inibir a infeção subsequente após uma infeção primária ou após vacinação contra esse vírus. Como tal, os seus níveis são muitas vezes usados como referência para avaliar a eficácia de determinadas vacinas, como é o caso da vacina contra a poliomielite e a gripe.⁴⁰ Também a eficácia do tratamento com plasma convalescente, usado já com sucesso no SARS, Ébola e gripe, depende da concentração de anticorpos neutralizantes contra o vírus de interesse no plasma de doadores recuperados.⁴¹⁻⁴³

Num estudo de Wu F *et al* foi feito um ensaio utilizando pseudovírus com o antigénio recombinante da proteína S do vírus SARS-CoV-2 para avaliar os níveis de anticorpos neutralizantes presentes no plasma de 175 doentes com sintomas ligeiros de COVID-19 considerados recuperados.³⁷ Tal como em outros estudos,^{26,28} foi observada uma correlação positiva entre o nível de NAbs e o título de anticorpos, medidos por ELISA, contra proteínas recombinantes da RBD, S1 e S2 de SARS-CoV-2, sugerindo inclusive que anticorpos contra diferentes domínios da proteína S (RBD, S1 e S2) possam todos eles apresentar atividade neutralizante. Em 6 doentes nos quais foi feita monitorização longitudinal dos anticorpos neutralizantes, o seu título foi baixo nos primeiros 10 dias de doença (ID50: < 200), atingindo um pico máximo entre os dias 10-15, e mantendo-se estáveis desde então. A atividade neutralizante foi variável entre os 175 doentes, sendo que à data de alta 30% destes apresentavam níveis muito baixos de NAbs, 17% níveis médios, 39% altos e 14% muito altos. Em 47 doentes nos quais foi feito seguimento após a alta, não foi detetada uma diferença estatisticamente significativa nos títulos de NAbs às 2 semanas de seguimento, incluindo aqueles que tinham títulos baixos à data de alta. Assim, parece que uma proporção de doentes recupera sem desenvolver títulos altos de anticorpos neutralizantes, evocando o papel de outros braços da imunidade, nomeadamente a celular, na sua recuperação.³⁷ Esta observação tem ainda implicações no uso de plasma convalescente no tratamento da COVID-19: uma vez que uma proporção de doentes recuperados apresenta títulos baixos de anticorpos neutralizantes, idealmente deverá ser feito o seu doseamento previamente à sua administração.

Um estudo preliminar em pré-publicação, usando um modelo de primatas não humanos (macacos *rhesus*) infetados

com SARS-CoV-2, mostrou que macacos recuperados após infeção primária, e no qual foi feito um *re-challenge* imunológico com a mesma dose de SARS-CoV-2 aos 28 dias após a infeção primária, não sofreram reinfeção. Os títulos de anticorpos neutralizantes eram elevados aos 21 e 28 dias pós infeção primária e, aos 5 dias após a reexposição, estes aumentaram ou mantiveram-se constantes.⁴⁴

Apesar de não existir até à data literatura definitiva que demonstre que a infeção primária por SARS-CoV-2 possa proteger contra exposições subsequentes, os dados provenientes destes estudos são encorajadores nesse sentido, permanecendo, no entanto, por esclarecer qual a duração dessa proteção. De facto, a duração da memória imunológica específica para determinado antigénio é variável. Estudos de *re-challenge* imunológico contra coronavírus da comunidade (HCoV-229E) sugerem que a imunidade protetora contra esses coronavírus possa desaparecer após 1 ano.⁴⁵ Nas infeções por MERS-CoV, estudos sugerem que os títulos de anticorpos IgG tendem a ser mais baixos e transitórios naqueles com doença ligeira ou subclínica. Quando comparados com aqueles com doença grave, nos quais foram detetáveis durante pelo menos 2 anos.⁴⁶

No que diz respeito ao SARS, um estudo de coorte de 56 doentes recuperados revelou uma correlação positiva marcada entre os títulos de anticorpos da classe IgG e de anticorpos neutralizantes, que atingiram um pico máximo aos 4 meses após o início da infeção e que diminuíram de forma gradual subsequentemente, sendo que, aos 2 anos de seguimento, 11,8% dos doentes não apresentavam anticorpos detetáveis.⁴⁷ Num período de seguimento de 3 anos, Cao *et al* demonstraram ainda que 74,2% e 83,9% dos doentes apresentavam, respetivamente, anticorpos da classe IgG e anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV aos 36 meses.⁴⁸ No entanto, num outro estudo composto por uma coorte de 176 doentes, apenas 50% dos doentes apresentavam anticorpos detetáveis por ELISA aos 3 anos.⁴⁹ Tang F *et al*, numa casuística de 23 doentes recuperados de SARS com o maior tempo de seguimento, sublinham que 6 anos após a infeção apenas 8,7% dos doentes apresentam anticorpos IgG detetáveis e em títulos muito baixos. De forma a perceber se estes doentes manteriam uma resposta anamnésica adequada perante uma potencial reinfeção, mediram a resposta de células B de memória periféricas contra SARS-CoV, que se encontrava ausente nos 23 doentes.⁵⁰ Estes achados sugerem que os anticorpos neutralizantes e da classe IgG presentes no plasma desaparecem de forma mais marcada 2 anos após a infeção por SARS-CoV, com células B de memória específicas indetetáveis aos 6 anos. Em todos estes estudos, a cinética da resposta humoral variou de acordo com a gravidade de sintomas, sendo que aqueles com doença mais grave (i.e., necessidade de admissão em cuidados intensivos e/ou ventilação mecânica) apresentavam anticorpos em títulos mais elevados e detetáveis durante mais tempo.

Conclusão

A interação entre o SARS-CoV-2 e as defesas do hospedeiro são o cerne da patogenia da COVID-19, sendo determinante no espectro de manifestações que a doença pode assumir. Apesar da utilidade das lições aprendidas com o SARS e com outros coronavírus humanos, parece que este novo coronavírus apresenta alguns mecanismos ímpares de interação com o hospedeiro. No entanto, muito permanece ainda por esclarecer e a investigação básica na área da imunologia proporcionará respostas necessárias quer para o controlo e prevenção da doença quer no seu diagnóstico e tratamento. Se a infeção por SARS-CoV-2 se tornar endémica e considerando que a imunidade protetora, à semelhança de outros coronavírus, desaparece com o tempo e parece ser dependente da gravidade da doença, o desenvolvimento de uma vacina será necessário quer para proteção da população naïve quer daqueles que sobreviveram à infeção e que demonstrem um declínio da resposta imune com o tempo. ■

Responsabilidades Éticas

Conflitos de Interesse: Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento: Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Proveniência e Revisão por Pares: Comissionado; sem revisão externa por pares.

Ethical Disclosures

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financing Support: This work has not received any contribution, grant or scholarship.

Confidentiality of Data: The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of data from patients.

Provenance and Peer Review: Commissioned; without externally peer reviewed.

© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) 2019. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.

Correspondence/Correspondência: Margarida Tavares
margarida.tavares@chsj.min-saude.pt

Unidade de Doenças Infecciosas Emergentes, Serviço de Doenças Infecciosas, Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto, Portugal

Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 202-451 Porto, Portugal

Received/Recebido: 07/05/2020

Accepted/Aceite: 08/05/2020

Publicado / Published: 15 de Maio de 2020

REFERÊNCIAS

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536-44.
2. Silva C, Tavares M. Da emergência de um novo vírus humano à disseminação global de uma nova doença - Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19). Capítulo 2 - SARS-CoV-2: Virologia [dissertação Apresentada ao Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto] Porto:ISPUP;2020.
3. World Health Organization. Who.int [homepage na internet]. Emergency Preparedness Response. Pneumonia of Unknown Cause - China. Disease Outbreak News; 2020 [consultado 1 de maio de 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>.
4. World Health Organization. Who.int [homepage na internet]. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV); 2020 [consultado 1 de maio de 2020]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))
5. World Health Organization. Who.int [homepage na internet]. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020; 2020 [consultado 1 de maio de 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
6. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. *JAMA.* 2020 (in press). doi: 10.1001/jama.2020.0757.
7. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *N Engl J Med.* 2020;382:760-2. doi: 10.1056/NEJMe2001126
8. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020 ;92:418-23. doi: 10.1002/jmv.25681.
9. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020 (in press). doi: 10.1001/jama.2020.2648.
10. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant.* 2020;39:405-7.
11. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020;92:424-32.
12. Lokugamage KG, Hage A, Schindewolf C, Rajbaum R, Menachery VD. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. 2020. Artigo em pré-publicação: disponível em bioRxiv.
13. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020 (in press). doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
14. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. 2020. Artigo em pré-publicação. Disponível em: medRxiv.
15. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497-506. doi: 10.1093/cid/ciaa272.
16. Liu J, Li S, Liang B, Wang X, Wang H, Li W, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine.* 2020;55:102763.
17. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020 ;395:1054-62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
18. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell*

- Mol Immunol. 2020;17:541-3. doi: 10.1038/s41423-020-0401-3.
19. Ong EZ, Chan YFZ, Leong WY, Lee NMY, Kalimuddin S, Haja Mohideen SM, et al. A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. *Cell Host Microbe*. 2020 (in press). doi: 10.1016/j.chom.2020.03.021
 20. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;221:1762-9. doi: 10.1093/infdis/jiaa150.
 21. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382:1708-20. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
 22. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 (in press). doi: 10.1093/cid/ciaa248.
 23. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:533-5. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2.
 24. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 (in press). doi: 10.1093/cid/ciaa344.
 25. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 (in press). doi: 10.1093/cid/ciaa310.
 26. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:565-74. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
 27. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020 (in press). doi: 10.1128/JCM.00461-20.
 28. Okba NM, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020 (in press). doi: 10.3201/eid2607.200841
 29. Lin Q, Zhu L, Ni Z, Meng H, You L. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020 (in press). doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.015.
 30. Ferrara F, Temperton N. Pseudotype Neutralization Assays: From Laboratory Bench to Data Analysis. *Methods Protoc*. 2018;1. pii: E8. doi: 10.3390/mps1010008.
 31. Yolken RH. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. *Yale J Biol Med*. 1980;53:85-92.
 32. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016;60:111-20. doi: 10.1042/EBC20150012.
 33. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020;92:418-23. doi: 10.1002/jmv.25681.
 34. Qiu M, Shi Y, Guo Z, Chen Z, He R, Chen R, et al. Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities. *Microbes Infect*. 2005;7:882-9.
 35. Chen S, Lu D, Zhang M, Che J, Yin Z, Zhang S, et al. Double-antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to SARS-associated coronavirus in human serum. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:549-53.
 36. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 (in press). doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
 37. Wu F WA, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. 2020. Artigo em pré-publicação: disponível em medRxiv.
 38. Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee CD, So RTY, Lv H, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*. 2020;368:630-3. doi: 10.1126/science.abb7269.
 39. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11:1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
 40. Zinkernagel RM. On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:515-46.
 41. Wong VW, Dai D, Wu AK, Sung JJ. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*. 2003;9:199-201.
 42. Zhou B, Zhong N, Guan Y. Treatment with convalescent plasma for influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 2007;357:1450-1.
 43. van Griensven J, Edwards T, de Lamballerie X, Semple MG, Gallian P, Baize S, et al. Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2016;374:33-42. doi: 10.1056/NEJMoa1511812.
 44. Bao L DW, Gao H, Xiao C, Liu J, Xue J, et al. Lack of Reinfection in Rhesus Macaques Infected with SARS-CoV-2. 2020. Artigo em pré-publicação: disponível em bioRxiv.
 45. Callow KA, Parry HF, Sergeant M, Tyrrell DA. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol Infect*. 1990;105:435-46.
 46. Memish ZA, Perlman S, Van Kerkhove MD, Zumla A. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2020;395:1063-77. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33221-0.
 47. Liu W, Fontanet A, Zhang PH, Zhan L, Xin ZT, Baril L, et al. Two-year prospective study of the humoral immune response of patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis*. 2006;193:792-5.
 48. Cao WC, Liu W, Zhang PH, Zhang F, Richardus JH. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *N Engl J Med*. 2007;357:1162-3.
 49. Wu LP, Wang NC, Chang YH, Tian XY, Na DY, Zhang LY, et al. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1562-4.
 50. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011;186:7264-8.