

Análise temporal das concentrações de IgA e IgG em pacientes hospitalizados com Covid-19 de acordo com o desfecho clínico

Timeline analysis of IgA and IgG levels in Covid-19 hospitalized patients according to the clinical outcome

Thalia Medeiros¹; Fabiana R. Carvalho¹; Renan Faustino¹; Gabriel M. C. Guimarães¹; Lilian S. Alves¹; Any Caroline Oliveira¹; Elzinandes L. Azeredo²; Jorge R. Almeida¹; Luzia Maria O. Pinto²; Andrea Alice Silva¹

1. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. 2. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

Introdução: Estudos sugerem a associação entre a produção de anticorpos e a gravidade da coronavirus disease 2019 (Covid-19). **Objetivos:** Avaliar as concentrações de imunoglobulinas da classe A (IgA) e da classe G (IgG) durante a internação de pacientes com Covid-19 de acordo com o desfecho (sobrevivida *vs* óbito). **Materiais e métodos:** Pacientes com infecção pela síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (Sars-CoV-2) confirmada por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram incluídos neste estudo prospectivo. As amostras foram obtidas semanalmente durante o acompanhamento dos indivíduos, considerando o início dos sintomas. Os títulos de IgA e IgG anti-Sars-CoV-2 foram mensurados por meio de um imunoenensaio comercial. Correlações entre IgA/IgG e valores de limiar de detecção [*cycle thresholds* (Ct)] para os genes alvos *N1* e *N2* também foram avaliadas. **Resultados:** Estudamos 55 pacientes com Covid-19 (59,7 ± 6,2 anos; 63,6% do sexo masculino); destes, 28 (50,9%) morreram. Observamos positividade para IgA e IgG (IgA+/IgG+) em 90,9% e 80% dos pacientes, respectivamente. A maior frequência de IgA+ foi verificada nas semanas 2 e 3, e a maior frequência de IgG+, nas semanas 3 e 4. É importante observar que os pacientes que morreram apresentaram títulos de IgA mais baixos nas primeiras duas semanas ($p < 0,05$); no entanto, um aumento significativo na concentração de IgA foi observado nas semanas subsequentes. Por fim, identificamos correlações significativas entre os valores de Ct e imunoglobulinas; tanto IgA quanto IgG foram correlacionadas com Ct *N2* em pacientes que morreram. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que títulos mais baixos de IgA no início da Covid-19 – que estão associados a valores mais baixos de Ct – podem indicar pacientes com risco elevado de evoluir para óbito.

Unitermos: anticorpos; Covid-19; mortalidade.

ABSTRACT

Introduction: Studies suggest the association between antibody production and the severity of coronavirus disease 2019 (Covid-19). **Objectives:** To evaluate the concentrations of immunoglobulins class A (IgA) and class G (IgG) during the hospitalization period of Covid-19 patients according to the outcome (survival vs death). **Materials and methods:** Patients with severe acute respiratory syndrome of coronavirus 2 (Sars-CoV-2) infection confirmed by reverse transcriptase reaction followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) were included in this prospective study. Samples were obtained weekly during the follow-up of individuals, considering symptom onset. Titers of anti-Sars-CoV-2 IgA and IgG were measured using a commercial immunoassay. Correlations between IgA/IgG and cycle threshold (Ct) values for *N1* and *N2* target genes were also assessed. **Results:** We studied 55 Covid-19 patients (59.7 ± 6.2 years, 63.6% male), of which 28 (50.9%) died. We observed IgA and IgG positivity (IgA+ and IgG+) in 90.9% and 80% of patients, respectively. The highest IgA+ frequency was observed at weeks 2 and 3 and the highest IgG+ at weeks 3 and 4.

*It is important to note that patients who died presented lower IgA titers in the first two weeks ($p < 0.05$); however, a significant increase in IgA levels was observed in the subsequent weeks. Lastly, we identified that significant correlations between Ct values and immunoglobulins levels, both IgA and IgG were correlated with Ct N2 in patients who died. **Conclusion:** Our results suggest that lower IgA titers in early Covid-19, which is associated with lower Ct values, may indicate patients at higher risk for death.*

Key words: antibodies; Covid-19; mortality.

RESUMEN

Introducción: Los estudios sugieren una asociación entre la producción de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad por coronavirus 2019 (Covid-19). **Objetivos:** Evaluar las concentraciones de inmunoglobulinas clase A (IgA) y clase G (IgG) durante la hospitalización de pacientes con Covid-19 según el desenlace (supervivencia vs muerte). **Materiales y métodos:** Se incluyeron en este estudio prospectivo pacientes con síndrome respiratorio agudo severo de infección por coronavirus 2 (Sars-CoV-2) confirmado por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las muestras se obtuvieron semanalmente durante el seguimiento de los individuos, considerando la aparición de los síntomas. Los títulos de IgA e IgG anti-Sars-CoV-2 se midieron usando un inmunoensayo comercial. También se evaluaron las correlaciones entre IgA/IgG y los valores de los umbrales de ciclo [cycle threshold (Ct)] para los genes N1 y N2. **Resultados:** Se estudiaron 55 pacientes Covid-19 ($59,7 \pm 16,2$ años, 63,6% varones), de los cuales 28 (50,9%) fallecieron. Observamos positividad de IgA e IgG (IgA+ e IgG+) en el 90,9% y el 80% de los pacientes, respectivamente. La frecuencia más alta de IgA+ se observó en las semanas dos y tres y la IgG+ más alta en las semanas tres y cuatro. Es importante señalar que los pacientes que fallecieron presentaron títulos de IgA más bajos en las dos primeras semanas ($p < 0,05$); sin embargo, se observó un aumento significativo en los niveles de IgA en las semanas siguientes. **Conclusión:** Identificamos correlaciones significativas entre los valores de Ct y los niveles de Ig, tanto IgA como IgG se correlacionaron con Ct N2 en los pacientes que fallecieron. Nuestros resultados sugieren que los títulos de IgA más bajos en Covid-19 temprano, que se asocia con valores de Ct más bajos, pueden indicar que los pacientes tienen un mayor riesgo de muerte.

Palabras clave: anticuepos; Covid-19; mortalidad.

INTRODUÇÃO

A atual pandemia causada pela doença do coronavírus 2019 (Covid-19) atingiu o Brasil em fevereiro de 2020⁽¹⁾, levando a mais de 150.000 mortes em apenas oito meses após o início da circulação do vírus no país⁽²⁾. Em relação à gravidade da Covid-19, comorbidades anteriores e distúrbios de coagulação parecem comprometer a depuração viral e estão associados a desfechos adversos^(3, 4). Além disso, a resposta imunológica exacerbada, muitas vezes referida como tempestade de citocinas, também foi associada à gravidade da doença^(5, 6).

A resposta humoral contra a síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (Sars-CoV-2) é importante para o controle viral com a produção de anticorpos neutralizantes^(7, 8). Em relação à cinética de produção de anticorpos, os títulos de imunoglobulinas da classe M (IgM) e da classe G (IgG) parecem manter o mesmo perfil durante a infecção aguda⁽⁹⁾; entretanto, a imunoglobulina da classe A (IgA) tem sido descrita como um marcador precoce de infecção respiratória aguda por Sars-CoV-2,

apresentando também alta capacidade de neutralização viral⁽¹⁰⁾. Além disso, alguns estudos têm sugerido uma associação entre a produção de imunoglobulinas e a gravidade da doença⁽¹¹⁻¹³⁾. Nesse contexto, avaliamos as concentrações de IgA e IgG produzidas contra a subunidade S1 da proteína Spike do Sars-CoV-2 durante a hospitalização de pacientes com Covid-19 moderada a grave de acordo com o desfecho clínico (sobrevivida vs óbito). Utilizando parâmetros obtidos a partir da reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), ainda avaliamos a correlação entre as concentrações de IgA e IgG com os valores limiar de detecção (Ct).

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo e coleta da amostra

Conduzimos um estudo longitudinal prospectivo observacional realizado com pacientes hospitalizados com Covid-19. Todos os pacientes foram internados no período de abril

a julho de 2020 no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), localizado em Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, apresentando infecção moderada a grave. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense (CAAE: 30623520.5.0000.5243). Os dados demográficos e clínicos foram obtidos de prontuários dos pacientes.

As amostras de suabes nasofaríngeos foram coletadas pela equipe médica na admissão e, posteriormente, transportadas para o Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP) para o diagnóstico de Covid-19.

Amostras de soro de pacientes hospitalizados por Covid-19 foram coletadas para análises laboratoriais de rotina no Serviço de Patologia Clínica (HUAP). Recuperamos 116 amostras de 55 pacientes, que foram cuidadosamente verificadas quanto ao momento de progressão da doença após o início dos sintomas. Avaliamos os seguintes momentos, considerando o tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta de sangue: i) semana 1 (< 7 dias após o início dos sintomas; $n = 26$); ii) semana 2 (7-14 dias após o início dos sintomas; $n = 40$); iii) semana 3 (15-21 dias após o início dos sintomas; $n = 34$); e iv) semana 4 (> 21 dias; $n = 16$). As amostras de soro foram armazenadas a -80°C até o momento da análise.

Diagnóstico da infecção pelo Sars-CoV-2

A extração de ácido ribonucleico (RNA) foi realizada utilizando o *kit* QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RT-PCR foi realizado em três reações separadas por amostra para cada alvo – *NI*, *N2* e o controle interno sendo RNaseP humana (RP) – utilizando o *kit* 2019-nCoV RUO (catálogo nº 10006770, Integrated DNA Technologies, Inc – IDT, Iowa, EUA) e o GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (catálogo nº A6121, Promega Corporation, Wisconsin, EUA), também seguindo as especificações e os protocolos do fabricante. Os valores de Ct para *NI*, *N2* e RP foram analisados. É importante ressaltar que todos os testes para detecção de Sars-CoV-2 foram realizados na primeira semana após o início dos sintomas.

Testes sorológicos

As concentrações séricas de IgA e IgG produzidas contra a subunidade S1 da proteína Spike do Sars-CoV-2 foram mensuradas em todas as amostras utilizando o *kit* comercial Anti-Sars-CoV-2 Elisa IgG e IgA (Euroimmun, Lúbeck, Alemanha). As densidades ópticas (DOs) foram obtidas de acordo com as instruções do fabricante, e os resultados foram calculados de forma semiquantitativa, usando a relação DO das amostras (ou controles) dividida pela DO do calibrador. Quando o resultado era $\geq 1,1$, interpretava-se como positivo.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As comparações entre os dois grupos foram analisadas com o teste *t* de Student/Mann-Whitney de acordo com a distribuição das variáveis. Para três ou mais grupos, as diferenças foram calculadas utilizando a análise de variância (Anova)/Kruskal-Wallis com pós-testes de Bonferroni/Dunn, também de acordo com a distribuição das variáveis. As correlações entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e outras variáveis, como Ct e dias desde o início dos sintomas, foram calculadas, e os coeficientes de Spearman foram avaliados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

Características dos pacientes

Foram estudados 55 pacientes hospitalizados com Covid-19 admitidos no HUAP de abril a julho de 2020. As características demográficas e clínicas dos pacientes de acordo com o desfecho clínico estão descritas na **Tabela 1**. Em geral, os pacientes apresentaram uma média de idade \pm DP de $59,7 \pm 16,2$ anos; 63,6% ($n = 35$) eram do sexo masculino. Todos os pacientes hospitalizados apresentavam Covid-19 moderada a grave. Os sintomas mais frequentemente observados foram: febre (67,3%), tosse (61,8%), dispneia (47,3%) e hipóxia (41,8%). Esses sintomas foram identificados em associação com a presença de envolvimento pulmonar [por exemplo, padrão de vidro fosco na tomografia computadorizada (TC) torácica]. Os pacientes apresentaram comorbidades diversas, como diabetes (40%), doenças cardiovasculares (65,4%), câncer (23,6%) e obesidade (21,8%).

É importante ressaltar que, como esperado, os pacientes que morreram devido à Covid-19 ($n = 28$) apresentaram idade mais avançada ($52,6 \pm 17,3$ vs $66,5 \pm 11,8$ anos, para pacientes que sobreviveram e morreram, respectivamente; $p = 0,0004$) e maior frequência de complicações durante a internação, como desenvolvimento de Sars ($p = 0,0003$) e necessidade de cuidados intensivos ($p < 0,0001$), incluindo suporte de ventilação mecânica invasiva ($p < 0,0001$). Além disso, o tempo médio de internação \pm DP foi $26 \pm 17,6$ dias, sendo significativamente diferente entre os grupos ($33,8 \pm 22,6$ vs $19,4 \pm 7,2$ dias para pacientes que sobreviveram e morreram, respectivamente; $p = 0,001$).

TABELA 1 – Características demográficas e clínicas dos pacientes hospitalizados por Covid-19

Características	Total (n = 55)	Sobrevivência (n = 27)	Óbito (n = 28)	Valor de p
Idade (anos, média ± DP)	59,7 ± 16,2	52,6 ± 17,3	66,5 ± 11,8	0,0004
Masculino, n (%)	35 (63,6)	16 (59,2)	19 (67,8)	0,6
Comorbidades, n (%)				
Diabetes	22 (40)	8 (29,6)	14 (50)	0,2
DCV	36 (65,4)	16 (59,2)	20 (71,4)	0,4
DRC	9 (16,3)	4 (14,8)	5 (17,8)	1
DPOC	11 (20)	6 (22,2)	5 (17,8)	0,7
Imunossupressão	12 (21,8)	5 (18,5)	7 (25)	0,7
Câncer	25 (45,4)	11 (40,7)	14 (50)	0,6
Obesidade	12 (21,8)	5 (18,5)	7 (25)	0,7
Sintomas clínicos, n (%)				
Febre	37 (67,3)	20 (74,1)	17 (60,7)	0,4
Tosse	34 (61,8)	17 (62,9)	17 (60,7)	1
Dispneia	26 (47,3)	12 (44,4)	14 (50)	0,8
Saturação de O ₂ < 95%	23 (41,8)	10 (37)	13 (46,4)	0,6
Fadiga	26 (29,1)	9 (30)	7 (25)	0,6
Mialgia	6 (10,9)	4 (14,8)	2 (7,1)	0,4
Anosmia/ageusia	8 (14,5)	4 (14,8)	4 (14,3)	1
Cefaleia	6 (10,9)	2 (7,4)	4 (14,3)	0,4
Diarreia	6 (10,9)	3 (11,1)	3 (10,7)	1
Complicações durante hospitalização, n (%)				
Sars	32 (58,2)	9 (30)	23 (82,1)	0,0003
Admissão na UTI	32 (58,2)	8 (29,6)	24 (85,7)	< 0,0001
Ventilação mecânica	33 (50)	8 (29,6)	25 (89,3)	< 0,0001
Tempo de internação (dias, média ± DP)	26 ± 17,6	33,8 ± 22,6	19,4 ± 7,2	0,001

Os dados são expressos como média ± DP ou n (%). Os valores de p foram calculados usando o teste de Mann-Whitney ou teste do qui-quadrado. Valor de p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Covid-19: doença do coronavírus 2019; DP: desvio padrão; DCV: doença cardiovascular; DRC: doença renal crônica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; Sars: síndrome respiratória aguda grave; UTI: unidade de terapia intensiva.

Análise de IgA e IgG durante a hospitalização de pacientes com Covid-19

No geral, observamos positividade para IgA e IgG em 90,9% e 80% dos pacientes hospitalizados (n = 55), respectivamente. Além disso, observamos correlação significativa entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e os dias a partir do início dos sintomas em pacientes com Covid-19 moderada a grave (p < 0,0001), conforme demonstrado na **Figura 1**. Em seguida, avaliamos a frequência de positividade de IgA e IgG (IgA+ e IgG+) em cada momento do acompanhamento. Na semana 1, apenas quatro pacientes (30,9%) apresentavam IgA+. No entanto, essa taxa aumentou progressivamente para 85% e 94,4% na segunda e na terceira semanas de hospitalização, respectivamente (p < 0,0001 para a semana 1 vs semana 2, e semana 1 vs semana 3). Na semana 4, as concentrações séricas de IgA começaram a diminuir, mas isso não foi estatisticamente significativo (IgA+ de 94,4% para 88,9%, p = 0,3). Para IgG, a positividade foi de 23,1% na primeira semana e aumentou para

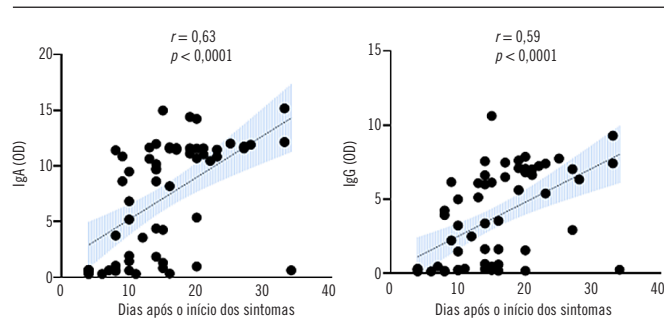


FIGURA 1 – Correlação entre os níveis séricos de IgA e IgG e dias após o início dos sintomas. Os coeficientes de Spearman (r) foram analisados

IgA: imunoglobulina classe A; IgG: imunoglobulina classe G; DO: densidade óptica.

60% na segunda semana (p = 0,005). Após a semana 2, IgG+ foi observada em 88,9% dos pacientes; essa taxa foi mantida até o final do acompanhamento (p < 0,0001 para a semana 1 vs semana 3 e semana 1 vs semana 4).

Curiosamente, algumas diferenças em relação à positividade de IgA e IgG foram observadas entre os grupos (sobrevivência vs óbito). Na primeira semana, a positividade de IgA e IgG foi observada em 41,7% dos pacientes que sobreviveram e 21,4% dos pacientes que morreram; entretanto, esses valores não foram estatisticamente significativos. Para IgG, notamos que essa diferença foi mais evidente na segunda semana (83,3% vs 50%, p = 0,05, sobrevivência vs óbito); no entanto, as taxas de IgA+ foram semelhantes entre os grupos nas semanas subsequentes.

É importante ressaltar que realizamos uma análise separada da positividade de IgA e IgG em pacientes imunocomprometidos (n = 12): um paciente transplantado renal, três pacientes com doença autoimune recebendo corticoideterapia e oito pacientes submetidos à quimioterapia. Observamos que apenas um paciente não foi positivo para IgA e IgG. Além disso, seis (50%) pacientes imunocomprometidos não apresentaram IgG+ até o final do acompanhamento.

Também avaliamos as concentrações de IgA e IgG semanalmente com o objetivo de avaliar a cinética de produção de anticorpos durante o período de internação, além de identificar quaisquer diferenças de positividade de anticorpos de acordo com o desfecho (sobrevivência vs óbito) (**Figura 2**). Observamos que os pacientes que morreram apresentaram concentrações mais baixas de IgA na semana 1 e concentrações significativamente mais baixas de IgA na semana 2 (p < 0,05) quando comparados com os pacientes que sobreviveram. Ademais, um aumento significativo nos níveis de IgA após 14 dias de acompanhamento foi observado apenas para pacientes que morreram (semana 1 vs semana 3, p < 0,01; e semana 1 vs semana 4, p < 0,05). A análise de IgG mostrou que ambos os grupos apresentaram aumento significativo nas concentrações de IgG também após a segunda semana; porém,

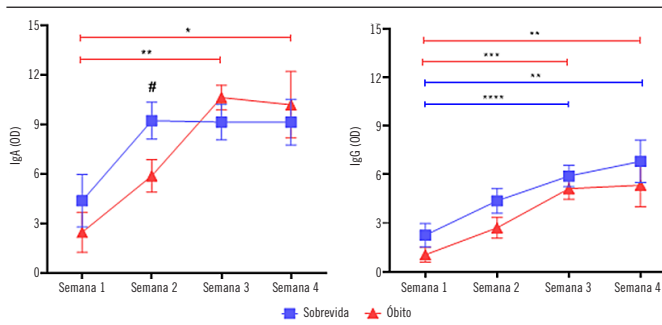


FIGURA 2 – Avaliação semanal dos níveis de IgA e IgG de acordo com o desfecho (sobrevivência vs óbito). Os dados são mostrados como média \pm EPM

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indicam a comparação entre os momentos para cada grupo (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; sobrevivência – linhas azuis vs óbito – linhas vermelhas); # $p < 0,05$ indica a comparação entre sobrevivência vs óbito no momento 7-14 dias (teste de Mann-Whitney).

IgA: imunoglobulina classe A; IgG: imunoglobulina classe G; EPM: erro padrão da média; DO: densidade óptica.

não foram observadas diferenças entre os grupos quando os momentos foram analisados separadamente. Entretanto, as concentrações médias de IgG de pacientes que sobreviveram foram discretamente superiores em todos os momentos analisados.

Associações entre imunoglobulinas e valores de Ct

Por fim, para identificar possíveis associações entre concentrações séricas de imunoglobulinas e carga viral, avaliamos IgA e IgG em associação com os valores de Ct obtidos na RT-PCR, que são representativos da carga viral⁽¹⁴⁾. Quando considerados todos os pacientes, observamos correlação significativa entre os valores de Ct para *N1* e *N2* e as concentrações séricas de IgA ($p = 0,03$ e $p = 0,007$, respectivamente). Nenhuma correlação significativa foi observada para IgG. Curiosamente, ao avaliar os pacientes de acordo com o desfecho, observamos apenas correlações entre imunoglobulinas e Ct *N2* ($r = 0,757$ e $p = 0,01$ para IgA vs *N2*; e $r = 0,745$ e $p = 0,01$ para IgG vs Ct *N2*) em pacientes não sobreviventes.

TABELA 2 – Correlações entre as concentrações de IgA e IgG e Ct para os valores do gene alvos *N1* e *N2* da Sars-CoV-2 na semana 1 de acordo com o desfecho

	IgA		IgG	
	Correlação com valores Ct		Correlação com valores Ct	
	<i>N1</i>	<i>N2</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
Todos os pacientes ($n = 55$)	$r = 0,491$ $p = 0,03$	$r = 0,6$ $p = 0,007$	$r = 0,386$ $p = 0,1$	$r = 0,445$ $p = 0,06$
Sobrevivência ($n = 27$)	$r = 0,4$ $p = 0,3$	$r = 0,45$ $p = 0,2$	$r = -0,083$ $p = 0,8$	$r = 0,067$ $p = 0,8$
Óbito ($n = 28$)	$r = 0,474$ $p = 0,1$	$r = 0,757$ $p = 0,01$	$r = -0,596$ $p = 0,07$	$r = 0,745$ $p = 0,01$

Os coeficientes de Spearman (r) foram analisados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (em negrito).

IgA: imunoglobulina da classe A; IgG: imunoglobulina da classe G; Ct: limite de detecção; Sars-CoV-2: síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2.

Não foram observadas correlações entre as concentrações de imunoglobulinas e os valores de Ct nos pacientes que sobreviveram. Esses resultados são apresentados na **Tabela 2**.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como foco a avaliação dos títulos de IgA e IgG anti-Sars-CoV-2 durante a hospitalização de pacientes com Covid-19. No geral, observamos uma frequência mais alta de positividade para IgA nas semanas 2 e 3, e para IgG nas semanas 3 e 4. Vários estudos publicados relatam dados sobre a detecção de anticorpos durante a Covid-19. Nossos dados corroboram os estudos que demonstram picos de produção de IgA em 10-14 dias após o início dos sintomas^(12,13,15,16) concomitantemente com concentrações de IgG começando a aumentar^(13, 16-18); no entanto, resultados diferentes podem ser encontrados na literatura sobre a cinética de anticorpos durante a progressão da Covid-19. Por exemplo, Beavis *et al.* (2020)⁽¹⁹⁾ também compararam IgA e IgG produzidas contra a subunidade S1 da proteína Spike em 82 amostras positivas para Sars-CoV-2 e observaram 100% de positividade para IgG na primeira semana após o diagnóstico; mas não ficou claro quando o diagnóstico foi realizado, considerando o início dos sintomas.

No geral, identificamos positividade para IgA e IgG em 90,9% e 80% dos pacientes hospitalizados, respectivamente. Esses resultados corroboram outros estudos que mostram positividade para IgA superior a 90% nas primeiras quatro semanas de acompanhamento, com uma frequência ligeiramente inferior de positividade de IgG^(15,16,20). Apesar do elevado número de estudos na área, os dados relativos à produção de anticorpos em Covid-19 ainda são escassos e precisamos considerar a possibilidade de diferentes cinéticas de anticorpos produzidos contra diferentes alvos e o uso de vários tipos de *kits* comerciais com diferentes sensibilidades, além das características do paciente, como imunossupressão e outras comorbidades. Em nossa coorte, a alta prevalência de pacientes com câncer (25/55; 45,4%), especialmente aqueles em quimioterapia (8/25; 32%), poderia ter influenciado as taxas de soroconversão. No entanto, o estudo recente de Marra *et al.* (2020)⁽¹⁷⁾ mostrou que a soroconversão em pacientes com câncer infectados com Sars-CoV-2 é semelhante à resposta de anticorpos IgG em indivíduos sem comorbidades⁽¹⁷⁾.

Vale salientar que observamos uma discreta diminuição na taxa de positividade de IgA após 21 dias de acompanhamento. Em nossa coorte, o número de pacientes que atingiu o momento da “semana 4” foi reduzido ($n = 16$). Isso provavelmente se deve ao elevado número de pacientes que morreram antes de completar 21 dias de internação (18/28; 64,3%). De fato, o tempo médio de internação de pacientes que morreram foi significativamente menor. Contudo, outros estudos também demonstram a diminuição das concentrações

de IgA 3-4 semanas após o início dos sintomas^(13, 15, 20, 21). Isso é muito importante para a aplicação do IgA no diagnóstico de Covid-19 durante a fase aguda. Nesse sentido, Guo *et al.* (2020)⁽¹⁶⁾ observaram que a combinação de sorologia anti-Sars-CoV-2 e detecção de RNA viral por RT-PCR melhora significativamente o desempenho diagnóstico, sobretudo nos casos que apresentam RT-PCR negativo com apresentação clínica típica. Em conjunto, esses dados sugerem que a IgA poderia ser usada para o diagnóstico de Covid-19 com alta sensibilidade de sete a 21 dias após o início dos sintomas, no caso de impossibilidade de realização de testes moleculares para casos inconclusivos.

Nosso próximo passo foi avaliar as concentrações de imunoglobulinas em uma abordagem longitudinal de acordo com o resultado clínico. Observamos que os pacientes que morreram apresentaram títulos de IgA mais baixos nas semanas 1 e 2 em comparação com os pacientes que sobreviveram; no entanto, isso mudou imediatamente na terceira semana de acompanhamento, quando as concentrações de IgA continuaram a aumentar nos pacientes que morreram. Para os pacientes que sobreviveram, a IgA atingiu um platô. Verificamos ainda uma tendência semelhante para IgA ao comparar pacientes críticos com pacientes que não desenvolveram síndrome respiratória aguda grave nem necessitaram de suporte invasivo de O₂ (dados não mostrados). Semelhante aos nossos resultados, Fourati *et al.* (2020)⁽¹¹⁾ também observaram que os pacientes que morreram apresentavam títulos de imunoglobulinas significativamente menores na admissão na unidade de terapia intensiva (UTI), e concentrações mais elevadas de IgA foram consideradas como fator protetor. Considerando esses resultados, sugerimos que a diminuição das concentrações séricas de imunoglobulinas anti-Sars-CoV-2, especialmente IgA, em um momento precoce durante o período de hospitalização, pode ser indicativo de mau prognóstico. Isso pode ser reflexo de uma resposta imunológica retardada, levando a uma produção insuficiente de anticorpos, os quais podem ser essenciais para o combate à infecção por Sars-CoV-2⁽⁹⁾. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o potencial neutralizante desses anticorpos.

Com base nisso, avaliamos as correlações entre os títulos de imunoglobulinas e os valores de Ct. Estudos anteriores demonstraram fortes associações significativas entre a carga viral de Sars-CoV-2 e a gravidade da doença^(14, 22). Como os valores de Ct obtidos do RT-PCR são representativos da carga viral, nosso objetivo foi avaliar se as concentrações séricas de IgA e IgG poderiam estar associadas a esse marcador promissor de gravidade de Covid-19. Observamos que, em pacientes que morreram, tanto IgA quanto IgG foram significativa e diretamente correlacionadas com os valores de Ct para o gene alvo *N2*. Ou seja, pacientes que apresentam menores valores de

Ct na admissão (alta carga viral) também apresentam menores títulos de IgA e IgG. Semelhante aos nossos dados, um estudo recente realizado com pacientes graves com Covid-19 também observou correlações significativas entre as concentrações de IgA e IgG com os valores de Ct⁽¹¹⁾. É importante mencionar que os valores de Ct na admissão têm se mostrado fortes fatores preditivos independentes associados ao óbito por Covid-19⁽²²⁾. Assim, considerando a importância da resposta humoral no combate a Sars-CoV-2^(7, 8, 23), pode-se notar que concentrações mais baixas de imunoglobulinas nas primeiras duas semanas de infecção aguda estão associadas a alta carga viral, o que poderia impactar diretamente na resposta contra o vírus.

Posteriormente na progressão de Covid-19, alguns estudos demonstram que concentrações mais elevadas de IgA anti-Sars-CoV-2, bem como IgA total, estão aumentadas em pacientes graves^(12, 13, 15, 24). Essas observações seguem de acordo com nossos resultados, nos quais os pacientes que morreram apresentaram aumento significativo das concentrações de IgA na terceira e na quarta semanas de internação. Concentrações mais elevadas de IgA também foram associadas a hipóxia e lesões pulmonares extensas⁽¹²⁾. Zhang *et al.* (2020)⁽²¹⁾ demonstraram associação entre aumento do risco de morte e concentrações elevadas de IgA, além de outras anormalidades laboratoriais, como trombocitopenia e aumento das concentrações de proteína C reativa. Além disso, títulos de IgG mais elevados e soroconversão mais rápida também foram verificados em pacientes graves⁽²⁵⁾; isso pode ser reflexo da resposta imune exacerbada observada durante a progressão de Covid-19 grave.

Nosso estudo tem algumas limitações. Apesar da pequena coorte ($n = 55$), não pudemos obter amostras de soro de todos os pacientes em todos os momentos. Como mencionado anteriormente, uma parcela significativa de nossos pacientes morreu de Covid-19 (50,9%), a maioria deles antes da quarta semana de acompanhamento, o que prejudicou nossa análise pareada. O tempo médio de internação foi de 26 dias; portanto, não foi possível realizar um seguimento em longo prazo. É importante ressaltar que não avaliamos os títulos de IgM durante o período de hospitalização de pacientes com Covid-19, no entanto, alguns estudos relatam maior sensibilidade para IgA durante a fase aguda⁽¹⁰⁾.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a IgA pode ser utilizada para o diagnóstico de Covid-19 nos estágios iniciais da hospitalização (sete a 21 dias após o início dos sintomas). Também observamos alta frequência de positividade de IgG após 14 dias de acompanhamento. As associações verificadas entre as concentrações de IgA e os valores

de Ct podem indicar que pacientes com maior risco de gravidade de Covid-19 e óbito também apresentam títulos mais baixos de IgA nas duas primeiras semanas de acompanhamento. Portanto, a alta carga viral associada a menores concentrações de imunoglobulinas em um estágio inicial durante a infecção aguda pode impactar diretamente na resposta ao vírus e aumentar o risco de mortalidade, mesmo em pacientes imunocompetentes. Mais estudos são necessários para confirmar esses achados.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

À Thalia Medeiros e à Fabiana R. Carvalho, que contribuíram igualmente para este estudo.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, #001), Prefeitura de Niterói, Universidade Federal Fluminense e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, REDE COVID-19 #27968*6).

REFERÊNCIAS

1. Rodriguez-Morales AJ, Gallego V, Escalera-Antezana JP, et al. COVID-19 in Latin America: the implications of the first confirmed case in Brazil. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 35: 101613. doi:10.1016/j.tmaid.2020.101613.
2. Carvalho TA, Boschiero MN, Marson FAL. COVID-19 in Brazil: 150,000 deaths and the Brazilian underreporting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021; 99(3): 115258. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115258.
3. Argenziano MG, Bruce SL, Slater CL, et al. Characterization and clinical course of 1000 patients with coronavirus disease 2019 in New York: retrospective case series. *BMJ.* 2020; 369.
4. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol.* 2020; 95: 834-47.
5. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2020.
6. Varchetta S, Mele D, Oliviero B, et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2020; 1-9.
7. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity.* 2020; 52: 910-41.
8. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the Immune System. *Physiol Res.* 2020; 379-88.
9. Lippi G, Mattiuzzi C. Clinical value anti-SARS-CoV-2 serum IgA titration in patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2020.
10. García LF. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front Immunol.* 2020; 11.
11. Fourati S, Hue S, Pawlatsky JM, Mekontso-Dessap A, de Prost N. SARS-CoV-2 viral loads and serum IgA/IgG immune responses in critically ill COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 2020; 46: 1781-3.
12. Xue M, Zhang T, Hu H, et al. Predictive effects of IgA and IgG combination to assess pulmonary exudation progression in COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2020.
13. Ma H, Zeng W, He H, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17: 773-5.
14. Xu T, Wang J, Hu B, et al. Identification of the RNase-binding site of SARS-CoV-2 RNA for anchor primer-PCR detection of viral loading in 306 COVID-19 patients. *Brief Bioinform.* 2020.
15. Yu H, Sun B, Fang Z, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur Respir J.* 2020; 56: 2001526.
16. Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020; 71: 778-85.
17. Marra A, Generali D, Zagami P, et al. Seroconversion in patients with cancer and oncology healthcare workers infected by SARS-CoV-2. *Ann Oncol.* 2020; S0923-7534: 42965-5.
18. Tré-Hardy M, Wilmet A, Beukinga I, et al. Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies. *J Med Virol.* 2020.
19. Beavis KG, Matushek SM, Abeleda APF, et al. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J Clin Virol.* 2020; 104468.
20. Dahlke C, Heidepriem J, Kobbe R, et al. Distinct early IgA profile may determine severity of COVID-19 symptoms: an immunological case series [Internet]. *Infect Dis (except HIV/AIDS)*; 2020 Apr [citado em 5 nov 2020]. Disponível em: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.14.20059733>.

21. Zhang L, Fan T, Yang S, et al. Comparison of clinical characteristics of COVID-19 between elderly patients and young patients: a study based on a 28-day follow-up. *Aging*. 2020; 12: 19898-910.
22. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A narrative systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19. *Infect Dis Ther*. 2020; 573-86.
23. Chao YX, Röttschke O, Tan EK. The role of IgA in COVID-19. *Brain Behav Immun*. 2020; 87: 182-3.
24. Hasan Ali O, Bomze D, Risch L, et al. Severe COVID-19 is associated with elevated serum IgA and antiphospholipid IgA-antibodies [Internet]. *Infect Dis (except HIV/AIDS)*; 2020 Jul [citado em 5 nov 2020]. Disponível em: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.07.21.20159244>.
25. Marklund E, Leach S, Axelsson H, et al. Serum-IgG responses to SARS-CoV-2 after mild and severe COVID-19 infection and analysis of IgG non-responders. Walsh SR, editor. *PLoS ONE*. 2020; 15: e0241104.

AUTOR CORRESPONDENTE

Andrea Alice Silva  0000-0001-5856-6128
e-mail: aasilva@id.uff.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.