

Roteiro para testagem serológica de COVID19 em Portugal

Promotor
Instituto Gulbenkian de Ciência
da Fundação Calouste Gulbenkian

Grupo de Trabalho Ad-Hoc:

André Peralta Santos, Escola Nacional de Saúde Pública, UNL
António Silva Graça, Fundação Calouste Gulbenkian
António Vaz Carneiro, Fac. Med., ULisboa
Carlos Penha Gonçalves, Instituto Gulbenkian de Ciência
Gabriela Gomes, UPorto e University of Strathclyde (UK)
Guilherme Gonçalves, ICBAS, UPorto
Joana Sá, NOVA SBE, UNL
Jorge Carneiro, Instituto Gulbenkian de Ciência
Jorge Soares, Fundação Calouste Gulbenkian
Miguel Portela, Universidade do Minho
Paulo Jorge Nicola, Fac. Med., ULisboa
Pedro Aguiar, Escola Nacional de Saúde Pública, UNL
Pedro Campos, Instituto Nacional de Estatística
Pedro Magalhães, Instituto de Ciências Sociais, ULisboa
Pedro Pita Barros, NOVA SBE, UNL
Ricardo Águas, University of Oxford (UK)
Rui Portugal, Fac. Med., ULisboa
Soraia Pereira, Centro de Estatística e Aplicações, FCUL
Telmo Nunes, Fac. Med. Vet, ULisboa
Tiago A. Marques, CEAUL, FC, ULisboa, University of St Andrews (UK)

Roteiro para testagem serológica de COVID19 em Portugal

Sumário Executivo

Já é claro que a primeira onda da epidemia COVID19 em Portugal teve, em dez semanas, um impacto na economia de dimensões históricas, estando ainda por determinar as suas consequências na coesão do tecido social.

A **testagem serológica é um instrumento poderoso** para determinar a dispersão e intensidade de transmissão que o vírus atingiu durante a primeira onda da epidemia. É fundamental conhecer a **real dimensão da epidemia** no país para melhor informar o processo de decisão na resposta às prováveis próximas vagas.

Realça-se que a legítima expectativa de uma **baixa prevalência da COVID19** em Portugal exige um rigor acrescido na condução dos estudos serológicos. Estão a multiplicar-se estudos parcelares que podem facilmente levar a **erros grosseiros de estimativa da prevalência**. Ainda que tenham validade parcelar, estes estudos, são instintivamente extrapolados para o país podendo gerar **percepções de risco exageradas ou indesejáveis sensações de falsa segurança** - e até mesmo originar decisões erradas por parte das autoridades públicas.

Urge a realização de um **estudo de âmbito nacional** numa amostra que garanta **representatividade da população** ao longo do território nacional e um **nível de precisão elevado nas estimativas da prevalência**.

Este roteiro propõe primariamente um estudo nacional em **5.000 indivíduos** que constituam uma **população sentinela** testada ao longo do tempo o que permitirá obter **informação fidedigna sobre a dinâmica epidemiológica** da COVID19 que evoluirá nas nossas populações por tempo indeterminado.

A execução do estudo nacional contará com:

- Envolvimento **do Instituto Nacional Estatística** no desenho amostral com base no Inquérito Nacional de Saúde de 2019.
- Utilização dos mecanismos de aquisição e gestão de dados do INE.
- Colaboração da **ANMP** no envolvimento dos **municípios** para apoiar transporte de amostras.
- Testes serológicos de grande fiabilidade implementados por um **consórcio de institutos biomédicos de Lisboa** e que serão disponibilizados **ao Instituto Nacional de Saúde (INSA)**.

Preconiza-se o envolvimento das **estruturas regionais/locais de saúde** na colheita de amostras de sangue.

A implementação de **medidas restritivas de mobilidade e circulação pessoal** resultou no **sucesso de controlo** da transmissão da doença que deve ser continuado pela **rigorosa avaliação epidemiológica**. Inquéritos de sero-prevalência COVID 19 recentemente iniciados em **Espanha**, Suíça e Alemanha seguem este padrão e dão **primazia ao rigor epidemiológico**.

O estudo nacional proposto, que supera outros rastreios em curso, será decisivo para que **Portugal seja apontado como um exemplo de rigor** na adoção de medidas de **vigilância epidemiológica** focadas em proteger a nossa população.

Este roteiro considera um **conjunto de outros estudos sero-epidemiológicos** que incluem rastreios sectoriais ou localizados, que têm o mérito de identificar indivíduos que tenham sido infectados, fatores de risco ou focos de transmissão do vírus. O roteiro propõe que todos os **dados** obtidos nestes estudos sejam coligidos para que haja um **acesso centralizado para apoiar a decisão das autoridades**.

Roteiro para testagem serológica de COVID19 em Portugal

MOTIVAÇÃO

A recuperação da atividade socio-económica após a primeira onda da pandemia COVID19 deve ser concertada com a evolução da situação epidemiológica. A testagem serológica é um instrumento chave para **aferir o grau de vulnerabilidade da população e monitorizar a dinâmica da epidemia COVID19**.

Os inquéritos de sero-prevalência permitem obter respostas quantitativas a perguntas específicas, nomeadamente:

- **Que percentagem** de população foi infetada, até ao declínio da primeira onda?
- **Que grupos etários** e outros estratos da população foram mais infetados e quais os fatores de risco associados?
- **Que regiões** têm uma maior proporção de população não infectada por COVID19?
- **Como está a evoluir** a exposição da população ao vírus da COVID19?

É crítico que as respostas a estas perguntas sejam obtidas através de medidas diretas e pelo cálculo de **valores reais da dispersão do vírus na população** ao longo no território nacional, que substituirão com vantagem as atuais estimativas indiretas e falíveis, quando se trata de uma doença cujo comportamento epidemiológico é ainda pouco conhecido.

A obtenção de **taxas de sero-prevalência** reais é determinante para guiar as decisões sobre confinamento porque: são **diretamente informativas** sobre a situação epidemiológica existente e; porque aumentarão a **precisão dos modelos preditivos** da transmissão do vírus na população portuguesa. Por exemplo, vai ser possível determinar **taxas de letalidade reais** (nr. de mortes/nr. de infectados), ou calcular com maior precisão o **nr. básico de reprodução R_0** (taxas de sero-prevalência maiores significam R_0 maior e portanto maior transmissão na comunidade), ou ainda estimar ao longo do tempo o **nr. efetivo de reprodução R_t** que é um **indicador da adequação das medidas** ao controlo da transmissão.

ABORDAGEM

A utilidade e validade da testagem serológica estão criticamente dependentes do desenho dos inquéritos sero-epidemiológicos. Os **resultados são mais robustos quando a amostra a testar é probabilística**, reduzindo ao mínimo o enviesamento das estimativas que vão informar decisões de política de saúde pública de enorme importância.

Amostras de conveniência, que recrutem indivíduos para serem testados sem cuidar da seleção aleatória das localidades onde vivem e dos alojamentos, **irão inevitavelmente subestimar grupos sociais** onde a prevalência e vulnerabilidade podem ser muito heterogéneas em relação às da restante população.

Estão disponíveis os resultados preliminares de alguns estudos realizados noutros países, bem como o anúncio de estudos a realizar (Tabela 1). Alguns destes estudos recorrem a **amostras de conveniência** (dadores de sangue), o que pode, com elevada probabilidade, causar **viés na estimativa da prevalência** pelo facto do recrutamento ser afectado por critérios clínicos e da sua estrutura etária poder não corresponder à da população. Outros estudos têm limitações de generalização por se focarem em *hotspots* com altas incidências (Gangelt) mas não são informativos para a penetração da infecção na população geral.

Um estudo iniciado no passado dia 27 de Abril em **Espanha** - coordenado pelo Centro Nacional de Epidemiologia na dependência do **Instituto de Salud Carlos III**

e com apoio metodológico para o desenho amostral do **Instituto Nacional de Estatística espanhol** — utiliza uma amostra representativa a nível provincial, regional e autonómico com testes em 30,000 lares, aplicando uma **seleção aleatória de domicílios**. Resultados preliminares deste estudo relevam que a seroprevalência nacional ronda os 5%, com significativa variação ao longo do território implicando que o sistema de saúde **não detectou 90% das infecções** e que um **terço das pessoas tiveram infecções assintomáticas**.

Tabela 1. Exemplos de estudos de sero-prevalência realizados ou em curso.

Local do estudo	Base amostral	Data	Nº de soros	sero-prevalência	Teste
Dinamarca (1)	Dadores de sangue	6-8 de abril	3989	1.9%	Se:1/6 Sp:1/200
Oise, França (2)	Dadores de sangue	20-24 de março	200	3.0%	S-Flow
Gangelt, Alemanha (3)	Rastreio	Princípio de abril	500	14.0%	ND
Holanda (4)	Dadores de sangue	6-12 de abril	4194	3.2%	Antigen sandwich assay
Escócia, RU (5)	Dadores de sangue	21-23 de março	500	1.0%	Micro neutralização + ELISA
Santa Clara, EUA (6)	Rastreio	3-4 de abril	3300	2.8%	Lateral flow SE:95% SP:97.5%
Espanha (7)	Rastreio	27 de abril a 10 de maio	70.000	5%	ND

1. <https://bloddonor.dk/coronavirus/>
2. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.21.20068858v1>
3. https://www.land.nrw/sites/default/files/asset/document/zwischenenergebnis_covid19_c_ase_study_gangelt_0.pdf
4. https://www.tweedekamer.nl/sites/default/files/atoms/files/tb_jaap_van_dissel_1604_1.pdf
5. <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/04/17/2020.04.13.20060467.full.pdf>
6. <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/04/17/2020.04.14.20062463.full.pdf>
7. <https://www.isciii.es/Noticias/Noticias/Paginas/Noticias/ComienzoENECOVIDEstudioSeroprevalencia.aspx>

ESTUDOS DE SEROPREVALÊNCIA DA COVID19

O **objectivo primordial** deste roteiro é a execução de um estudo com as características de **representatividade nacional e regional**, congénere do estudo espanhol, mas adaptado às especificidades do contexto português. Para atingir esse objectivo, e dada a menor prevalência no caso português, propomos um **roteiro de estudos epidemiológicos**. Em particular, tendo em atenção a informação que será mais relevante no apoio à tomada de decisão pelas autoridades sanitárias na **modulação de medidas restritivas**, propomos duas linhas de execução neste roteiro: uma linha **nacional** (com crescente escala, intensidade e granularidade) e outra **local ou sectorial**.

1. NACIONAL

Base da amostragem, questionário e colheita de amostras

O inquérito nacional de sero-prevalência COVID19 inclui a realização de **um questionário epidemiológico e a colheita de uma amostra de sangue** aos participantes e a subsequente realização dos **testes serológicos**.

O **Instituto Nacional de Estatística foi contactado no sentido de** construir a amostra e administra o questionário no terreno, ficando responsável pela **recolha e gestão dos dados** do questionário epidemiológico.. A base de amostragem utiliza informação sobre os alojamentos e baseia-se nos alojamentos selecionados para o **Inquérito Nacional de Saúde de 2019** com vantagens óbvias na maximização de informação já recolhida. Seguindo um esquema estratificado e multietápico a seleção de unidades primárias — agregações de alojamentos de residência principal — será aleatória com probabilidade proporcional ao número de **alojamentos** de residência principal, e os alojamentos são **selecionados aleatoriamente**. Em cada alojamento, deverão ser testados todos os membros do agregado familiar.

O **questionário epidemiológico** incluirá itens relacionados com aspectos ligados à transmissão e patologia da COVID19.

Testes serológicos laboratoriais

O estudo avaliará a **sero-conversão de anticorpos IgM e IgG em testes individuais** utilizando métodos já implementados por um consórcio de institutos biomédicos portugueses (**consórcio serology4COVID**) e que serão disponibilizados ao **Instituto Nacional de Saúde**.

Grande parte dos testes serológicos atualmente disponíveis no mercado têm taxas de sensibilidade e de especificidade que ficam aquém do desejável. O **consórcio serology4COVID** desenvolveu testes laboratoriais de imunoensaio ELISA, baseados no protocolo do Prof. Florian Krammer(Mount Sinay, NYC, USA). Os resultados iniciais do processo de validação indicam que o teste tem 100% de sensibilidade e 99.4% de especificidade, estando iniciado o processo de **validação inter-laboratorial que conta com a participação do INSA**.

Participantes

A participação é **voluntária**, sendo indispensável obter o **consentimento exposto e informado** dos participantes. Prevê-se que a participação será bastante elevada, tendo em conta a alta taxa de resposta obtida em inquéritos semelhantes. As **questões dos participantes** tenham sobre os testes serão respondidas de uma forma clara e serão explicadas as limitações do teste (falsos positivos, falsos negativos, incerteza sobre duração e natureza da imunidade), **sendo criada uma linha telefónica de atendimento** dedicada aos participantes. Os participantes testados só terão acesso ao **resultado do seu teste serológico por pessoal de saúde** que possa explicar as suas implicações de forma correta e detalhada.

Proteção de dados

Este estudo implica a recolha de dados pessoais e de saúde protegidos pelo RGPD. Diferentes **aspectos éticos** relativos ao consentimento informado, confidencialidade de informação e proteção de dados serão apreciados e **validados por entidades competentes**. Uma vez que o estudo de prevalência serológica não exige a identificação dos indivíduos, será estudado um mecanismo de **pseudo-anonimização das amostras laboratoriais** através da criação de código aleatório de participante. A análise dos dados usará apenas informação agregada ao nível de código postal.

Acesso aos dados e amostras

Os dados de seroprevalência agregados e estratificados por escalões etários e regiões geográficas serão **imediatamente disponibilizados às autoridades sanitárias**. O acesso a dados do inquérito epidemiológico para estudos mais detalhados com interesse académico serão acessíveis através de uma base de dados anonimizada e, em condições a especificar, serão disponibilizadas aos promotores do estudo.

PATAMARES DE ESTUDO

A linha de trabalho **nacional** comporta 3 patamares:

- Num **primeiro patamar**, o mais rapidamente possível e gerando resultados com a **maior brevidade possível**, a realização de um estudo-piloto nacional com o objetivo de testar uma amostra genuinamente representativa da população nacional e obter a **primeira estimativa fiável da prevalência real da infeção**. É de realçar a importância deste conhecimento **antes de uma eventual segunda onda**.
- Num segundo patamar, segue-se este conjunto inicial de indivíduos testados, como **uma população sentinela** a partir da qual se conduzirá um estudo longitudinal que permitirá **monitorizar as ondas da epidemia**. Este seguimento deverá ocorrer com regularidade poucos meses depois do primeiro patamar (prevê-se seguimento trimestral).
- Num terceiro patamar e após do estudo-piloto ter sido obtida a primeira estimativa fiável da prevalência real da infeção em território nacional, assim como testadas todas as componentes logística e de recolha e análise de dados, propõe-se um estudo mais vasto **com maior granularidade regional** e com poder estatístico para gerar **estimativas de sero-prevalência com grande precisão**.

Patamar 1: estudo-base

Resultados preliminares indicam que o teste a usar tem 100% sensibilidade e 99,4% especificidade sendo possível calcular a **precisão das estimativas de prevalência** a nível nacional com uma amostra aleatória de **5000 testados** (sem correções para estratificação; Reiczigel, Földi, Ózsvári 2010). Será equacionada a sobre-amostragem em regiões urbanas onde a prevalência é presumivelmente maior.

Nº de positivos	Prevalência aparente		Prevalência real	
	Estimativa	CI Wilson 95%	Estimativa	CI Blaker 95%
100	2%	[1.7%-2.4%]	1%	[0.7%-1.5%]
150	3%	[2.6%-3.5%]	2%	[1.6%-2.6%]
200	4%	[3.5%-4.6%]	3.1%	[2.5%-3.7%]
250	5%	[4.4%-5.6%]	4.1%	[3.5%-4.7%]
300	6%	[5.4%-6.7%]	5.1%	[4.5%-5.8%]

Patamar 2: Estudo longitudinal

A amostra recolhida no estudo-base será seguida como **população sentinela** com vista a monitorizar a **dinâmica da exposição ao vírus no território nacional**. Sendo expectável que o número de expostos que desenvolveram **doença assintomática** seja elevado, este estudo oferecerá **indicadores precoces** sobre **alterações da dinâmica** da infecção úteis na tomada de decisão das autoridades.

O **acompanhamento da taxa de seroconversão** poderá ser um importante indicador epidemiológico na gestão a **médio-longo prazo** da epidemia de Covid-19 e no **ajustamento das medidas de mitigação** de acordo com a taxa de transmissão da doença (R_t).

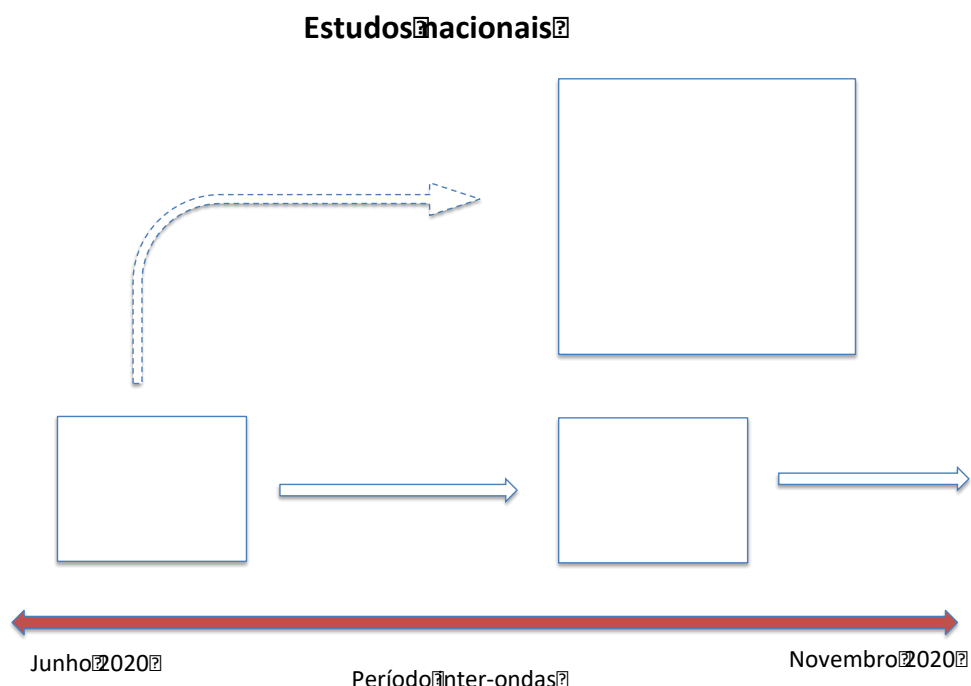
A **dinâmica da resposta por anticorpos** anti-SARS-Cov2 é de momento desconhecida, sendo um fator crítico para a definição de **estratégias de mitigação da doença de longo prazo**. Conjugando o acompanhamento serológico e o desenvolvimento de métodos para detectar anticorpos neutralizantes, a dinâmica das respostas imunológicas protetoras.

O recrutamento para este estudo manterá uma estratificação etária e regional representativa da população. Em função do resultado do primeiro teste os **indivíduos negativos serão seguidos para avaliar a dinâmica de seroconversão** e os **indivíduos positivos serão avaliados para a duração da resposta humoral**. Prevê-se uma **colheita trimestral** mas o intervalo entre colheita de amostras será ajustado de acordo com outros indicadores epidemiológicos (admissões hospitalares de casos graves e mortalidade no mês anterior).

Patamar 3: Estudo alargado

Propõe-se **um estudo nacional com uma amostra de grandes dimensões**, permitindo elevada precisão não apenas para estimativas de prevalência nacionais mas também dentro de estratos etários dentro das diferentes regiões do país (por exemplo, NUTII e escalões 15-24; 25-49; 50-69; 70+, a estabelecer). O estudo decorrerá quando os resultados do estudo-base, nomeadamente as estimativas de prevalência real ditam a possibilidade de obter estimativas precisas com mais granularidade dentro de dimensões amostrais exequíveis.

Também aqui **o desenho amostral ficará a cargo do Instituto Nacional de Estatística**, com as características genéricas do estudo-base mas com estratificações e níveis de precisão aumentados a determinar após análise dos resultados do estudo base e longitudinal, estimando-se uma amostra entre 25.000 a 30.000 indivíduos. A informação epidemiológica a recolher seria também afinada e fixada após análise do estudo-base.



2. ESTUDOS PARCELARES

Independentemente da linha de trabalho nacional culminar num estudo com substancial granularidade, pode haver iniciativas de estudos de “hotspots” promovidas pelas autoridades de saúde, e sabe-se também que estão em curso ou em planeamento iniciativas de municípios ou organizações da sociedade civil, que poderão ser da maior utilidade para complementar a linha de trabalho nacional.

Os estudos parcelares incluídos neste roteiro podem beneficiar de alguns dos mecanismos criados para os estudos de âmbito nacional:

- Apoio, ao desenho amostral;
- Apoio à anonimização de dados e cumprimento do RGPD.
- Apoio à recolha de informação epidemiológica;
- Apoio à execução dos testes
- Apoio à análise de dados incluindo modelação espaço-temporal

Exemplos de estudos parcelares propostos pelo grupo de trabalho.

1) Estudo longitudinal em profissionais de saúde de hospitais na região de Lisboa

Este estudo avaliará ao longo de vários meses profissionais de saúde que estão em contacto com pacientes COVID19 em hospitais de Lisboa. O estudo é conduzido pelo Instituto Gulbenkian de Ciência em colaboração com o Centro Hospitalar Lisboa Ocidental e com o Hospital Fernando da Fonseca (Amadora-Sintra) e outros hospitais que se venham a associar. Para além da evolução da sero-conversão nesta população o estudo, tem por objectivo identificar componentes virais e da resposta do hospedeiro (incluindo a resposta por anticorpos) que determinam a susceptibilidade à infecção e a resposta imunológica à COVID19 em profissionais de saúde que têm contacto frequente com doentes COVID19+ (linha da frente dos hospitais).

2) Inquérito Serológico Clínico-Epidemiológico em casos suspeitos de COVID-19

Este estudo procura evidência serológica dos casos suspeitos identificados pelo sistema de vigilância epidemiológica, que apoie decisões futuras de vigilância, controlo e prevenção da COVID-19 em Portugal aplicando o conceito de “Evidence-based Public Health”. O estudo será conduzido pelo ICBAS e compara o estatuto imunológico de casos suspeitos, identificados pelo sistema de vigilância da Direcção-Geral da Saúde (DGS) que após teste laboratorial virológico negativo tenham sido classificados como “não confirmados”, com casos “confirmados” e um grupo controlo não suspeito. Este estudo evidenciará se os casos suspeitos, não confirmados por diagnóstico virológico, foram expostos à infecção.

IMPLEMENTAÇÃO DO ESTUDO DE POPULAÇÃO SENTINELA

1. OPERAÇÃO

A implementação do estudo nacional para estabelecimento e análise de uma **população sentinela** opera através de um circuito que inclui **colheita de amostras** e **administração de questionários** epidemiológicos, **processamento de dados**, operação de **condicionamento e envio de amostras** e um **laboratório central** para execução e reporte das resultados serológicas.

Foi construído o seguinte modelo operativo:

a. Os domicílios dos participantes são comunicados aos entrevistadores (INE) e à estruturas de saúde regionais e locais.

b. Colheita de amostras: **Estruturas de saúde locais** colhem nos domicílios uma amostra de sangue de cada participante e transportam-na para local de acondicionamento designado. Apoio de transporte das **autarquias locais**.

c. Acondicionamento e envio de amostras: Em locais a designar pelas **estruturas locais de saúde**, as amostras são conservadas em refrigeração e enviadas a laboratório central. Apoio de transporte das **autarquias locais**.

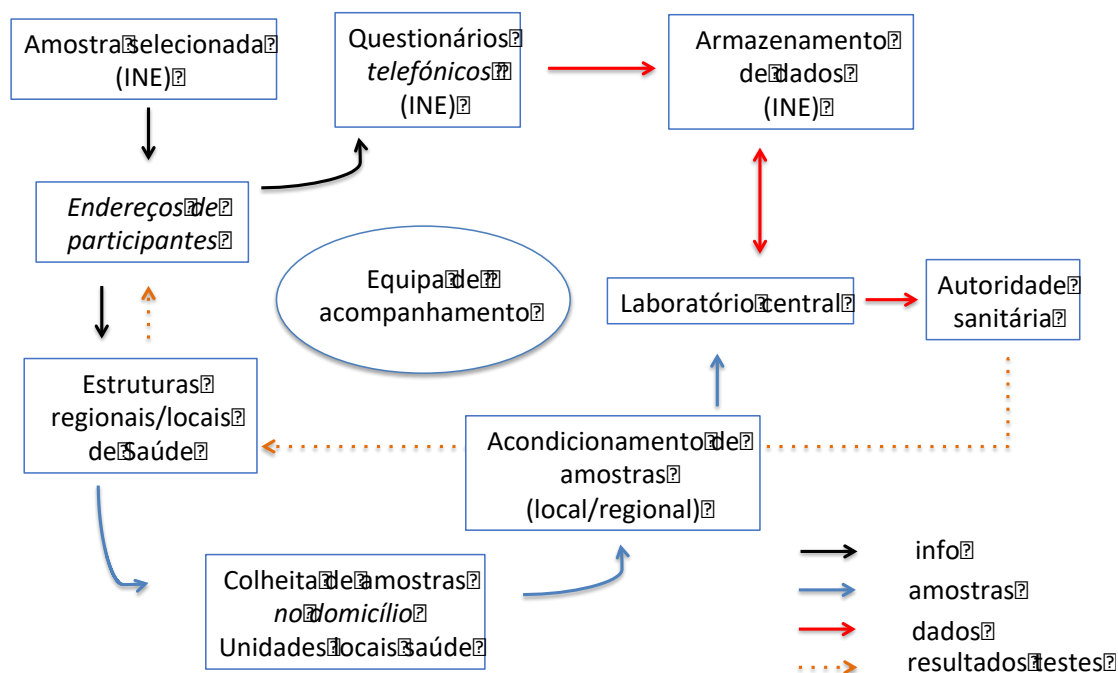
d. Questionários: Os **entrevistadores do INE** administram o questionário aos participantes, prevendo-se a possibilidade que a entrevista seja telefónica.

e. Os dados são adquiridos electronicamente e **depositados no INE**, com protocolos de gestão de dados estabelecidos e validados e utilizando o princípio da anonimização na divulgação da informação.

f. Resultados laboratoriais agregados por idade e região são comunicados à **autoridade sanitária**.

g. Uma equipa **FCG/IGC com elementos do grupo de trabalho Ad-Hoc** acompanhará e apoiará a execução do inquérito epidemiológico.

Seroprevalência em população sentinela: Modelo operativo



2. LOGÍSTICA

Os meios humanos e materiais necessários às várias ações implicam interação de diferentes entidades.

a. Recursos Humanos

- Equipa de acompanhamento a montar pela FCG/IGC, que contará com membros do Grupo Ad-Hoc;
- Pool de entrevistadores;
- Equipas de saúde de unidades locais para colheita de sangue;
- Profissionais de saúde/laboratório para acondicionamento e envio de amostras;
- Pessoal para execução dos testes serológicos laboratoriais.

b. Recursos materiais

- Questionário: Já construído pelo grupo de trabalho será informatizado no INE e disponibilizado para aquisição e gestão de dados (hardware e software);
- Colheita de amostras: material descartável de proteção e colheita descartáveis (seringas, agulhas, tubos de colheita) disponibilizados por unidades de saúde locais;
- Acondicionamento e envio de amostras; material para separação e envio de soro em refrigeração.
- Testes serológicos: Placas de teste ELISA disponibilizados pelo consórcio Serology4COVID.

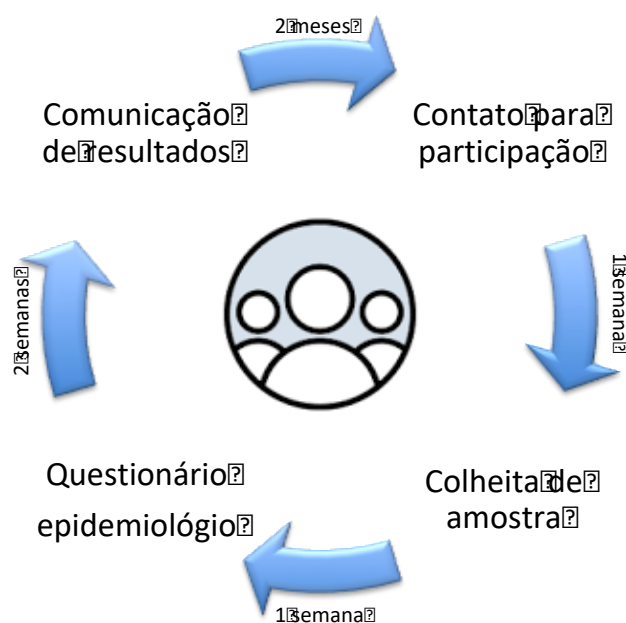
c. Transportes

- A colheita e envio de amostras poderão ser apoiadas por recursos municipais.

3. COORDENAÇÃO

- Pretende-se que a colheita de amostras antecede a colheita de dados e sejam feitas num período máximo de 2 semanas e que os resultados laboratoriais sejam comunicados no período de 2 semanas subsequente.

Ciclo de participação (população sentinela)



Referências:

Baguelin, M., Hoschler, K., Stanford, E., Waight, P., Hardelid, P., Andrews, N., & Miller, E. (2011). Age-specific incidence of A/H1N1 2009 influenza infection in England from sequential antibody prevalence data using likelihood-based estimation. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017074>

Guan, W., Liang, W., Zhao, Y., Liang, H., Chen, Z., Li, Y., ... He, J. (2020). Comorbidity and its impact on 1590 patients with Covid-19 in China: A Nationwide Analysis. *European Respiratory Journal*, 2000547. <https://doi.org/10.1183/13993003.00547-2020>

Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ, 2004. A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev. Vet. Med.* 65: 173-188.

Kieffer, A., Paboriboune, P., Crépey, P., Flaissier, B., Souvong, V., Steenkeste, N., ... de Lamballerie, X. (2013). 2009 A(H1N1) Seroconversion Rates and Risk Factors among the General Population in Vientiane Capital, Laos. *PLoS ONE*, 8(4), e61909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061909>

Liu W, Fontanet A, Zhang P, Zhan L, Xin Z, Baril L, Tang F, Lv H, Cao W. 2006. Two - Year Prospective Study of the Humoral Immune Response of Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *J Infect Dis.* 193(6):792–795. doi:10.1086/500469. [accessed 2020 Apr 20]. <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/500469>.

Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., ... Zhang, Z. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>

Reiczigel, Földi, Ózsvári (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test, *Epidemiology and Infection* 138:1674-1678

Vinh, D. N., & Boni, M. F. (2015). Statistical identifiability and sample size calculations for serial seroepidemiology. *Epidemics*, 12, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2015.02.005>