

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E  
BIOTECNOLOGIA

MARIANE EVARISTO

**O impacto da SARS-CoV-2 na medicina transfusional: avaliação da  
soroprevalência e da carga viral em doadores de sangue**

Ribeirão Preto

2023

MARIANE EVARISTO

**O impacto da SARS-CoV-2 na medicina transfusional: avaliação da soroprevalência e da carga viral em doadores de sangue**

**Versão Original**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestrado.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Evaristo, Mariane

O impacto da SARS-CoV-2 na medicina transfusional: avaliação da soroprevalência e da carga viral em doadores de sangue. Ribeirão Preto, 2023.

77p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a). Dra. Simone Kashima Haddad

1. SARS-CoV-2. 2. Transmissão transfusional. 3. Carga viral. 4. Soroprevalência.

Nome: EVARISTO, Mariane

Título: O impacto da SARS-CoV-2 na medicina transfusional: avaliação da soroprevalência e da carga viral em doadores de sangue

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

A minha família, pelo amor, admiração, gratidão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela fé, pela força, por me guiarem, por me abençoarem e por me iluminarem, por me permitirem lutar e enfrentar os obstáculos até o fim desta jornada.

A minha família: minha mãe Iodete, meu pai Fernando e minhas irmãs Isamara, Edvania e Elisnaira, por serem a minha raiz, por acreditarem em mim. por serem meus exemplos de humildade, de simplicidade, por me ensinarem a ser paciente, por me ouvirem quando eu só queria chorar diante das dificuldades e também das comemorações.

A minha amiga Sabrina, por ser um exemplo de amizade verdadeira, desde a Graduação. Por ser a amiga com quem discuto os mais diversos tipos de assuntos, por ser a primeira pessoa que eu chamo para festejar mas também a primeira que eu ligo quando preciso de um ombro amigo para chorar.

A Dra. Simone Kashima Haddad, por me orientar e contribuir com o meu crescimento científico e intelectual, por ser confiar em mim para desenvolver este trabalho,

A Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, por me dar a oportunidade de realizar o curso de mestrado profissional.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular pelos ensinamentos, pelo trabalho em conjunto, pela parceria nas diferentes etapas do projeto, por me permitirem ver de perto a vida de um cientista, por contribuírem na realização deste trabalho. Obrigada por todo o carinho, compreensão e ajuda disponibilizada.

A todos os laboratórios que disponibilizaram suas estruturas e auxiliaram na concretização deste trabalho.

## **Financiamento e suporte para desenvolvimento do projeto**

O presente trabalho foi realizado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), com os seguintes apoios financeiros: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (INCTC/CNPq) (465539/2014-9), Centro de Terapia Celular / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CTC/Fapesp) (2013/08135-2) e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena.”

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

Evaristo, M. **O impacto da SARS-CoV-2 na medicina transfusional: avaliação da soroprevalência e da carga viral em doadores de sangue.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Em dezembro de 2019, um surto de pneumonia de causa desconhecida foi identificado em Wuhan, na China. O agente etiológico se tratava de um vírus nomeado como Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). Este foi o terceiro surto de infecções respiratórias virais causadas por  $\beta$ -coronavírus a nível mundial. Esta infecção é predominantemente caracterizada como uma infecção do trato respiratório e o contato com gotículas respiratórias e aerossóis de uma pessoa infectada é o principal meio de transmissão do vírus, causando a doença denominada no COVID-19 que pode apresentar manifestações clínicas diversas, desde assintomáticos até sintomas graves do trato respiratório. Embora não haja evidências sobre a replicação viral do SARS-CoV-2 nas células do sangue periférico, este vírus pode se disseminar para outros órgãos utilizando a circulação sanguínea, portanto, a possibilidade de transmissão transfusional de SARS-CoV-2 pode ocorrer. A transfusão de sangue é um procedimento indispensável nos cuidados com a saúde, contudo, é uma prática que não está isenta de riscos. Os riscos são multifatoriais e a segurança do paciente pode ser comprometida principalmente pelo risco de transmissão de agentes infecciosos virais via transfusão. Para detectar a presença de vírus transmissíveis por transfusão em doadores de sangue foi implantado os testes de ácidos nucleicos (NAT) e testes sorológicos para detecção de anticorpos. Este estudo apresenta informações relevantes no contexto da transmissão transfusional, uma vez que o objetivo do projeto é determinar a soroprevalência e avaliar a presença do RNA de SARS-CoV-2 no plasma de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto do ano de 2020. A análise de soroprevalência apresentou 4,8% (31/646) de positividade. Já a análise de detecção de RNA de SARS-CoV-2 por RT-PCR apresentou positividade de 3,07% (11/358) em amostras de plasma e o cálculo do número de cópias genômicas de SARS-CoV-2 (cópias/ $\mu$ L) nestas amostras apresentaram quantificação entre  $5,1 \times 10^3$  e  $4,1 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L. Nossos achados indicam uma baixa prevalência de RNAemia de SARS-CoV-2 no plasma de doação de sangue e, quando detectado, o RNA viral está em baixa concentração nesta amostras. Mesmo em doadores de sangue que não apresentam alta carga virêmica de SARS-CoV-2, conhecer a carga viral, e não somente um resultado detectado/não detectado em um teste qualitativo, pode fornecer orientação sobre a transmissão transfusional. Embora sejam necessários estudos adicionais sobre a transmissibilidade, vários estudos não mostraram infecciosidade por baixa carga viral SARS-CoV-2 em doadores de sangue.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Transmissão transfusional; Carga viral; Soroprevalência.

## ABSTRACT

Evaristo, M. **The impact of SARS-CoV-2 on transfusion medicine: assessment of seroprevalence and viral load in blood donors.** 2023. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

In December 2019, an outbreak of pneumonia of unknown cause was identified in Wuhan, China. The etiological agent was treated as a virus named Severe Acute Respiratory Syndrome Virus (SARS-CoV-2). This was the third outbreak of viral respiratory infections caused by  $\beta$ -coronavirus worldwide. This infection is predominantly characterized as a respiratory tract infection and contact with respiratory droplets and aerosols from an infected person is the main means of transmission of the virus, causing the illness related to COVID-19 that can present diverse clinical manifestations, from asymptomatic to severe symptoms of tract infections. Although there is no evidence of viral replication of SARS-CoV-2 in peripheral blood cells, this virus can spread to other organs that use blood circulation, therefore, the possibility of transfusional transmission of SARS-CoV-2 may occur. Blood transfusion is an essential procedure in health care, however, it is a practice that is not free of risks. The risks are multifactorial and patient safety may be compromised mainly by the risk of transmission of viral infectious agents via transfusion. To detect the presence of transfusion-transmissible viruses in blood donors, nucleic acid tests (NAT) and serological tests for antibody detection were implemented. This study presents relevant information in the context of transfusional transmission, since the objective of the project is to determine the seroprevalence and evaluate the presence of SARS-CoV-2 RNA in the plasma of blood donors from the Hemocenter of Ribeirão Preto in the year 2020. The seroprevalence analysis showed 4.8% (31/646) of positivity. The analysis of detection of SARS-CoV-2 RNA by RT-PCR showed positivity of 3.07% (11/358) in plasma samples and the calculation of the number of genomic copies of SARS-CoV-2 (copies/  $\mu$ L ) in these samples were quantified between  $5.1 \times 10^3$  and  $4.1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L. Our findings indicate a low prevalence of SARS-CoV-2 RNAemia in blood donation plasma and, when detected, viral RNA is in low concentration in these samples. Even in blood donors who do not have a high SARS-CoV-2 viremic load, knowing a viral load, not just a detected/undetected result in a qualitative test, can provide guidance on transfusional transmission. Although additional studies on transmissibility are needed, several studies have not demonstrated low viral load SARS-CoV-2 infectivity in blood donors.

Keywords: SARS-CoV-2; Transfusion Transmission; Viral load; Seroprevalence.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gráfico de setores indicando a soroprevalência de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em doadores de sangue no ano de 2020. 29
- Figura 2** – Distribuição do número de casos de COVID-19 notificados pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto no ano de 2020 e a soroprevalência observada em doadores de sangue no mesmo período. 30
- Figura 3** – Análise por microscopia óptica para investigar a presença de efeito citopático em células Vero-CCL81 cultivadas com amostras de plasma positivas para SARS-CoV-2. 35
- Figura 4** – Representação gráfica das curvas de amplificação e da curva validadas para a análise de carga viral de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real. 37
- Figura 5** – Curva padrão utilizada para a quantificação da carga viral de amostras de plasma com positividade molecular de RNA de SARS-CoV-2 utilizando protocolo *singleplex*. 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Percentual de amostras de doadores de sangue submetidas à detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente ao número total de doações de sangue realizadas no Hemocentro de Ribeirão Preto (sede), mês a mês, no ano de 2020.	28
<b>Tabela 2</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) dos genes virais E, N, RdRp e RNase P resultantes da detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR no plasma e no <i>buffy coat</i> de doadores de sangue, no período de outubro de 2020 a abril de 2021.	31
<b>Tabela 3</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) dos genes virais E gene, N gene, RdRp e do IC: controle interno (RNase P), resultantes da detecção molecular em 11 doadores de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto, no período de dezembro de 2021 a janeiro de 2022.	32
<b>Tabela 4</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) dos genes virais N1, N2 e do controle interno (IC) RNase P resultantes da detecção molecular em 5 doadores de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto, utilizando protocolo <i>Center for Disease Control and Prevention</i> (CDC).	33
<b>Tabela 5</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) dos genes virais E gene, N gene, RdRp e do IC: controle interno (RNase P), relativo ao estudo retrospectivo de SARS-CoV-2 no plasma de doadores de sangue com informação pós-doação no Hemocentro de Ribeirão Preto.	34
<b>Tabela 6</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) dos genes virais N1, N2 e do controle interno (IC) RNase P das amostras de plasma sanguíneo de indivíduos infectados com SARS-CoV-2, cultivadas em células de linhagem Vero-CCL81.	34
<b>Tabela 7</b> – Valores de <i>cycle threshold</i> (Ct) obtidos a partir da diluição seriada do Padrão Internacional para o RNA de SARS-CoV-2 da Organização Mundial de Saúde (código NIBSC: 20/146) por RT-PCR em tempo real.	36
<b>Tabela 8</b> – Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma de doadores de sangue utilizando alvo N2.	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 ASPECTOS GERAIS	15
1.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE INFECÇÃO DO SARS-COV-2	15
1.3 INFECÇÕES VIRAIS EM DOADORES DE SANGUE	16
1.4 TESTES MOLECULARES E SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2	17
1.5 APRESENTAÇÃO DA PROPOSTA	19
<b>2 OBJETIVOS</b>	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
3.1 CASUÍSTICA	21
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	21
3.3 ESTUDO RETROSPECTIVO - AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA (ANTI-IGG SARS-COV-2) EM DOADORES DE SANGUE NO ANO DE 2020	21
3.4 DETECÇÃO DE RNA DE SARS-COV-2 EM AMOSTRA DE PLASMA PELO TESTE DE RT-PCR	22
<b>3.4.1 Extração do RNA- método automatizado</b>	23
<b>3.4.2 Extração do RNA - Método manual</b>	23
<b>3.4.3 RT-PCR - método <i>Center for Disease Control and Prevention (CDC)</i></b>	23
<b>3.4.4 RT-PCR - método comercial <i>GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit (OSANG Healthcare)</i></b>	24
<b>3.4.5 Estudo prospectivo de RNA-SARS-CoV-2 em plasma de doadores de sangue</b>	25
<b>3.4.6 Estudo retrospectivo de RNA-SARS-CoV-2 em plasma de doadores de sangue</b>	25
<b>3.4.7 Estudo retrospectivo em doadores de sangue com informação pós-doação (PDI)</b>	25
3.5 ANÁLISE DA REPLICAÇÃO VIRAL A PARTIR DE PLASMA POSITIVO PARA SARS-COV-2	26
3.6 ANÁLISE DA CARGA VIRAL EM AMOSTRAS DE PLASMA POSITIVAS PARA SARS-COV-2	26
<b>4 RESULTADOS</b>	28
4.1 ESTUDO RETROSPECTIVO - AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA (ANTI-IGG SARS-COV-2) EM DOADORES DE SANGUE NO ANO DE 2020	28
4.2 DETECÇÃO DO RNA DE SARS-COV-2 EM PLASMA DE DOADORES DE SANGUE	30
<b>4.2.1 Estudo prospectivo em doadores de sangue</b>	30
<b>4.2.2 Estudo retrospectivo em doadores de sangue</b>	31

<b>4.2.3 Estudo retrospectivo em doadores de sangue com informação pós-doação (PDI)</b>	33
4.3 ANÁLISE DA REPLICAÇÃO VIRAL DE SARS-COV-2 A PARTIR DE AMOSTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO	34
4.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE DA CARGA VIRAL DE SARS-COV-2	35
<b>4.4.1 Análise da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma sanguíneo</b>	38
<b>5 DISCUSSÃO</b>	40
5.1 AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA IGG EM DOADORES DE SANGUE	41
5.2 DETECÇÃO DE RNA-SARS-COV-2 EM PLASMA DE DOADORES DE SANGUE	43
5.3 CASO DE POSITIVIDADE EM DOADOR ASSINTOMÁTICO	46
5.4 POTENCIAL DE REPLICAÇÃO VIRAL DE SARS-COV-2 NO PLASMA	47
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL EM AMOSTRAS DE PLASMA POSITIVO PARA SARS-COV-2	48
<b>6 CONCLUSÃO</b>	53
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	54

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

Em dezembro de 2019, um surto de pneumonia de causa desconhecida foi identificado em Wuhan, na China (SHEREEN et al., 2020). Os primeiros casos confirmados foram epidemiologicamente associados a um mercado local de animais vivos e frutos do mar (BURKI, 2020). O agente etiológico em questão se tratou de um  $\beta$ -coronavírus, nomeado como Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2, do inglês *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*).

O SARS-CoV-2 foi descrito pela primeira vez por Zhu e colaboradores (2020) mediante análises de metagenômica viral, sequenciamento de genoma completo, reação em cadeia de polimerase (PCR) e cultura viral realizados em três amostras de lavagem broncoalveolar de pacientes adultos chineses com pneumonia grave.

Este foi o terceiro surto de infecções respiratórias virais causadas por  $\beta$ -coronavírus a nível mundial. A primeira foi em 2002 com o Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave - SARS-CoV e a segunda em 2012 com o Vírus da Síndrome Respiratória do oriente Médio - MERS-CoV (CHANG; YAN; WANG, 2020).

As características do SARS-CoV-2 que dão a dimensão de desafio são: alta transmissibilidade, elevados casos de assintomáticos circulantes, índice de mortalidade, baixa patogenicidade (LU et al., 2020).

O primeiro caso confirmado da doença do coronavírus (COVID-19, do inglês *Coronavirus disease*) no Brasil, foi relatado em fevereiro de 2020 e desde então, duas ondas epidêmicas resultam em um número significativo e preocupante de casos em todo o território nacional (OLIVEIRA et al., 2020). Até o presente relatório, o país já conta com mais 37 milhões de casos confirmados acumulados e mais de 700 mil óbitos registrados pela COVID-19 (BRASIL, 2023).

### 1.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE INFECÇÃO DO SARS-COV-2

A análise filogenética do SARS-CoV-2 classifica-o na ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae* e gênero  $\beta$ -coronavírus (SHEREEN et al., 2020; PHAN, 2020). Os  $\beta$ -coronavírus apresentam genoma composto por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, sentido positivo, com tamanho de

aproximadamente 30 mil pares de base. Os vírions são envelopados e apresentam seis estruturas de leitura aberta funcionais (ORFs) organizadas em replicases (ORF1a / ORF1b), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e proteína S ou proteínas *spike* (S), a qual está projetada na sua superfície externa caracterizando a sua morfologia de coroa (PHAN, 2020).

Para iniciar o processo infeccioso viral no organismo hospedeiro, é necessário a ligação de partículas virais a receptores de superfície celular (WANG et al., 2020). O SARS-CoV-2 utiliza suas proteínas S para promover esta ligação. Uma vez que esta proteína se liga na superfície da célula, através das atividades das proteases celulares que clivam as suas subunidades principais: S1 e S2, contribuindo para a infecção do vírus nas membranas celulares (HOFFMANN et al., 2020). O receptor celular utilizado por SARS-CoV-2 é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (LI et al., 2003) que emprega a serina protease celular TMPRSS2 para o *priming* da proteína S (GLOWACKA et al., 2011).

O SARS-CoV-2 é predominantemente caracterizado como uma infecção do trato respiratório (PATEL et al., 2020), portanto o contato com gotículas respiratórias e aerossóis de uma pessoa infectada é o principal meio de transmissão do vírus, causando a doença nomeada como COVID-19, que é semelhante a um resfriado comum ou gripe. O período de incubação deste vírus pode variar de 2 a 14 dias para o desenvolvimento de sintomas. Devido a sua alta transmissibilidade, se espalha facilmente entre pessoas de todas as idades, apresentando manifestações clínicas diversas, que vão desde ausência de sintomas (assintomáticos) até sintomas graves do trato respiratório (GALANTI et al., 2019; CHANG; YAN; WANG, 2020; BACKER; KLINKENBERG; WALLINGA, 2020). Quando os sintomas são graves, como a lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo, corre-se o risco de evolução da doença para insuficiência pulmonar, podendo resultar em óbito (SHEREEN et al., 2020).

### 1.3 INFECÇÕES VIRAIS EM DOADORES DE SANGUE

A transfusão de sangue é um procedimento que se tornou indispensável quando se pensa em cuidados com a saúde, contudo, é uma prática que não está isenta de riscos. Os riscos apresentados são multifatoriais e a segurança do paciente pode ser comprometida principalmente pela mortalidade e morbidade associadas à

transfusão em pacientes que recebem o produto sanguíneo (FERREIRA et al., 2007; MARTINS; NOBREGA, 2018).

Os agentes infecciosos virais se tornaram preocupantes nos bancos de sangue desde a década de 1980, principalmente pela prevalência de portadores assintomáticos, bem como das doações de sangue durante o período de janela de infecções. A primeira infecção emergente de grande importância nos bancos de sangue foi o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (PERKINS; BUSCH, 2010; GOODNOUGH, 2013).

Um vírus que circule na corrente sanguínea durante a fase assintomática da infecção tem um potencial para ser transmitido por transfusão, independente se a fase infecciosa seja prolongada, por exemplo vírus da hepatite B (HBV) ou HIV, ou curta, como no caso do vírus do Nilo Ocidental (WNV) ou vírus da dengue (DENV). Contudo, para que haja suspeita de transmissão transfusional, outros fatores também devem ser avaliados, como: o tempo de sobrevivência e persistência do vírus no sangue ou componentes sanguíneos durante o período assintomático; o tempo que este hemocomponente é transfundido no receptor após a coleta; o mecanismo utilizado para causar uma infecção por via sanguínea; o estado imunológico do paciente transfundido e por fim se a doença foi identificada tanto no doador quanto no receptor do produto sanguíneo (STRAMER et al., 2009).

Para aumentar a segurança transfusional, foram implantados os testes de imunoenaios e os testes de ácidos nucleicos (NAT, do inglês *nucleic acid testing*) nos bancos de sangue. Os testes de imunoenaios, também chamados de sorológicos, apresentam alta sensibilidade para detectar anticorpos ou antígenos virais. Em complemento, o NAT detecta o ácido nucleico viral antes da soroconversão, ou seja, antes do aparecimento do anticorpo viral no sangue do doador (BUSCH, 2014; FAUCI; MORENS, 2016; STRAMER et al., 2009; ATEF; ATEF, 2019; STRAMER et al., 2004; KOSAN et al., 2010).

#### 1.4 TESTES MOLECULARES E SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2

Os testes para diagnóstico laboratorial da COVID-19 são uma ferramenta essencial para rastrear a propagação da doença. O diagnóstico correto e preciso

desempenha um papel importante na contenção da doença, permitindo implementações de medidas de controle que limitam a disseminação do vírus através da identificação dos casos, isolamento e rastreamento de contactantes (UDUGAMA et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

De modo geral, as infecções assintomáticas são confirmadas quando realizados testes laboratoriais moleculares, para detecção do agente viral, e testes sorológicos, para detecção de anticorpos (NISHIURA et al., 2020). Em testes sorológicos, a especificidade dos anticorpos produzidos pode ser usada para diferenciar o período de infecção. Os três tipos de anticorpos produzidos são: IgA, IgG e IgM, cujo a titulação aumenta ou diminui em diferentes ocasiões. IgM aumenta rapidamente com a infecção e diminui logo após a eliminação da infecção, seguida pela produção de IgG, empregado na maioria dos testes de anticorpo, por persistir por mais tempo e refletir a imunidade de longo prazo, embora seja o último a aumentar em uma infecção. Alternativamente, a mudança de classe também pode resultar na formação de IgA, que é produzida principalmente por células na superfície das mucosas (DEEKS et al., 2020; CHAO et al., 2020). As interpretações dos testes sorológicos ajudam na identificação de uma infecção recente ou passada, no controle da disseminação da doença, na avaliação das intervenções de saúde pública (como isolamento social) e na identificação dos indivíduos com imunidade adquirida, além de ser uma ferramenta útil para detectar infecção viral em indivíduos assintomáticos (DEEKS et al., 2020; AMANAT et al., 2020).

Os testes moleculares são baseados na detecção de ácidos nucleicos de patógenos específicos. A PCR é uma das técnicas mais utilizadas para este fim, pois possibilita a multiplicação de milhares de cópias a partir de uma fita de DNA molde. Com o avanço tecnológico, várias metodologias baseadas no princípio da PCR foram criadas. A técnica de Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR) em tempo real é um exemplo das variações da PCR, e consiste na transcrição da fita de RNA em uma fita de DNA complementar (cDNA) seguida de amplificação por PCR. Durante o processo de PCR, a sonda hibridiza com uma sequência alvo localizada entre os *primers* direto e reverso. Durante a fase de extensão do ciclo de PCR, a atividade da nuclease 5' da Taq polimerase degrada a sonda e separa o quencher do corante supressor, gerando um sinal fluorescente. Deste modo ocorre a quantificação do material genético a cada ciclo (VALONES et al., 2009).

A RT-PCR em tempo real apresenta uma grande sensibilidade e especificidade analítica para detecção de SARS-CoV-2, sendo considerado o teste padrão ouro para diagnóstico laboratorial em amostras de swab nasofaríngeo (BOHN et al., 2020). Estudos mostram que é possível detectar o RNA de SARS-CoV-2 em amostras de sangue com auxílio deste método, mesmo em amostras de carga viral baixa (CHANG, 2020). Sabe-se que a carga viral do SARS-CoV-2 no sangue pode variar de 2 a 4 cópias log por mililitro (mL) antes do início de quaisquer sintomas, confirmando que o RNA viral poderia ser detectado no sangue, ainda que em carga muito menor do que a observada no trato respiratório ou em amostras de fezes (SUN, 2020).

A necessidade de estudos adicionais do SARS-CoV-2 não se limita apenas às amostras respiratórias, mas se estende ao sangue. Os estudos até o momento têm sido prejudicados pela falta de quantificação da carga viral plasmática (FAJNZYLBER et al., 2020). Assim, é importante examinar amostras de diferentes fontes para validar a infecção.

## 1.5 APRESENTAÇÃO DA PROPOSTA

Diante do possível impacto que o SARS-CoV-2 poderia causar na segurança transfusional, a avaliação do plasma de doadores de sangue e o conhecimento da exposição prévia ao vírus se fez necessário. Para a compreensão desta infecção a partir do sangue, dois importantes questionamentos foram levantados:

- i) É possível conhecer a exposição prévia do doador de sangue ao SARS-CoV-2?
- ii) A carga viral de SARS-CoV-2 detectada em doadores de sangue assintomáticos desenvolve infecção em receptores de hemocomponentes?

A fim de responder essas perguntas, o presente estudo buscou determinar a soroprevalência e carga viral de SARS-CoV-2 no plasma de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a soroprevalência e avaliar a carga viral do RNA de SARS-CoV-2 no plasma de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG em doadores de sangue por meio de testes sorológicos;
- b) Avaliar a presença de RNA viral de SARS-CoV-2 nas amostras de plasma de doadores de sangue através do método molecular de RT-PCR em tempo real;
- c) Avaliar a presença de RNA viral de SARS-CoV-2, através do método molecular de RT-PCR, em amostras de plasma de doadores de sangue que relataram sintomas característicos da COVID-19 (Informação Pós-Doação, PDI);
- d) Quantificar a carga viral das amostras positivas para SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real;
- e) Avaliar o potencial de replicação viral em amostras de plasma sanguíneo positivas para SARS-CoV-2.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Para o estudo prospectivo da infecção por SARS-CoV-2, foram avaliadas amostras de plasma e *buffy coat* de candidatos a doação de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto. O estudo retrospectivo foi realizado a partir de amostras de plasma de doadores que efetuaram doação de sangue na instituição nos anos de 2020 a 2022. Em paralelo, foram selecionadas amostras de bolsas de plasma sanguíneo de doadores que relataram sintomas característicos da COVID-19 após doação de sangue (Informação Pós-Doação, PDI), no Hemocentro de Ribeirão Preto e em suas unidades.

#### 3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE 36614120.5.0000.5440) (Anexo 1). Como critérios de inclusão foram considerados indivíduos adultos, com maioria civil maior ou igual a 18 anos de idade. E como critérios de exclusão, indivíduos menores de idade, pacientes em uso de imunossupressores ou insuficiência renal ou hepática, neoplasias ou doenças autoimunes. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado aos participantes incluídos no estudo prospectivo. Para as amostras retrospectivas, a aplicação do TCLE foi dispensada e as análises foram realizadas de forma cega, por se tratar de amostras arquivadas, onde não houve o contato ou identificação do candidato (Anexo 2).

#### 3.3 ESTUDO RETROSPECTIVO - AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA (ANTI-IGG SARS-COV-2) EM DOADORES DE SANGUE NO ANO DE 2020

Para detecção semi-quantitativa de anticorpos IgG específicos para a subunidade S1 da proteína *spike* do SARS-CoV-2, utilizamos o kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (EUROIMMUN®) de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio de imun absorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)

baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas. A enzima usada para este ensaio foi a peroxidase, responsável por catalisar a reação da água oxigenada ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  e  $O_2$ . O teste é dividido em duas principais fases: Na primeira fase, o antígeno purificado (domínio S1 expresso de forma recombinante na linhagem celular humana HEK293) aderido aos poços da microplaca entra em contato com a amostra (100  $\mu$ L de plasma previamente diluído na proporção 1:101) e é incubado por 1 hora a 37°C. A reação antígeno-anticorpo ocorre em amostras que apresentam anticorpos para o SARS-CoV-2. Na segunda etapa, inclui-se um segundo anticorpo específico para a imunoglobulina humana (100  $\mu$ L de conjugado enzimático: anti-IgG humano marcado com peroxidase), com incubação de 30 minutos a 37°C. Ao adicionar o substrato na reação (100  $\mu$ L de solução de cromógeno) ocorre uma reação de cor após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente (18°C a 25°C) protegido da luz. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de plasma. Ao finalizar a incubação do substrato, adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de parada (que contém ácido sulfúrico) com o objetivo de parar a reação enzimática. A medida fotométrica da intensidade da cor foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm e um comprimento de onda de referência entre 620 nm e 650 nm dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada. Neste protocolo utilizamos controle positivo e negativo, juntamente com o calibrador do próprio kit, para garantir interpretação dos resultados. Os resultados foram calculados a partir da Densidade Óptica (DO), onde a razão (amostra/calibrador) foi interpretada da seguinte forma: <0,8 não-reagente;

$\geq 0,8$  a  $< 1,0$  inconclusivo;  $\geq 1,1$  reagente. Consideramos resultados inconclusivos como não-reagentes para as análises estatísticas.

### 3.4 DETECÇÃO DE RNA DE SARS-COV-2 EM AMOSTRA DE PLASMA PELO TESTE DE RT-PCR

Este ensaio foi realizado em quatro modelos de estudo: I- estudo prospectivo em doadores de sangue no período de outubro/2020 a abril/2021; II- estudo retrospectivo em doadores de sangue com informação pós doação; III- estudo retrospectivo em doadores que realizaram doação de sangue no período de dezembro/2021 a janeiro/2022; IV- pacientes internados com COVID-19.

#### 3.4.1 Extração do RNA- método automatizado

Para a etapa de extração de RNA viral, utilizamos o protocolo de extração automatizada com o equipamento Loccus Extracta 32 e Extracta Kit – RNA e DNA Viral (MVXA-P016FAST). A extração do RNA viral se baseia em etapas de lise, ligação, lavagem e eluição dos ácidos nucleicos através da camada de dióxido de silício que reveste as *beads* magnéticas e adsorve moléculas negativamente carregadas, promovendo a sua ligação com as moléculas de ácidos nucleicos presentes na amostra. Na etapa de lise, adicionamos 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K e 100  $\mu\text{L}$  de amostras de plasma ou *buffy coat* em aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise para iniciar a extração do RNA viral. Posteriormente, ocorre a ligação por afinidade do RNA às *beads* magnéticas. A última etapa compreende a eluição do RNA viral extraído em tampão de eluição. O processamento da reação ocorre em 28 minutos. O volume de RNA é eluído em aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  com  $> 95\%$  (em 100 cópias) de acurácia de purificação.

#### 3.4.2 Extração do RNA - Método manual

Utilizamos o protocolo de extração manual Qiamp Viral Mini kit (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. Este protocolo promove a extração do RNA viral com a combinação das propriedades de ligação seletiva a uma membrana à base de

gel de sílica. Inicialmente, 140 µL de plasma é lisado utilizando 5,6 µL do *carrier* e 560 µL de AVL Buffer, sob condições altamente desnaturantes para inativar RNAses e garantir o isolamento de RNA viral intacto. Em seguida, utilizamos 560 µL de Etanol 100% a fim de fornecer a ligação ideal do RNA à membrana à base de gel de sílica. O RNA se liga à membrana e os contaminantes são lavados em duas etapas, usando dois tampões de lavagem diferentes: 500 µL de Buffer AW1 e 500 µL de Buffer AW2. Por fim, o RNA foi eluído em 60 µL de tampão AVE Buffer, pronto para uso direto ou armazenamento em freezer -20 °C.

### 3.4.3 RT-PCR - método *Center for Disease Control and Prevention* (CDC)

Realizamos a amplificação do RNA de SARS-CoV-2 seguindo as instruções do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) para análise das amostras de plasma e *buffy coat*. Neste protocolo, os iniciadores e sondas foram desenhados para as regiões do nucleocapsídeo do vírus (N1 e N2) e RNase P (controle endógeno) em formato *singleplex*. Para o preparo da reação foi utilizado *GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega). Para cada 1 mL de *GoTaq Probe qPCR master mix (2X)* foi adicionado 2 µL de corante de referência carboxi-X-rodamina - CXR. A reação foi preparada nos seguintes volumes: 6,3 µL de *GoTaq Probe qPCR master mix + CXR*; 0,3 µL de *GoScript RT Mix para 1-Step RT-qPCR*; 0,2 µL de iniciadores *forward* e 0,2 µL de iniciadores *reverse*; 0,2 µL de sondas. O volume total de mix utilizado foi 7,4 µL e o volume de RNA utilizado foi de 5,1 µL. Os seguintes ciclos e temperaturas foram utilizados para a amplificação dos genes virais: 30 minutos a 45°C para transcrição reversa, seguidos por 45 ciclos a 95°C por 2 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em todas as reações foram adicionados controles negativos e positivos para validação dos resultados. As reações foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems 7500*.

### 3.4.4 RT-PCR - método comercial *GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit* (OSANG Healthcare)

A amplificação do RNA de SARS-CoV-2 pela reação de RT-PCR também foi realizada de acordo com o kit comercial *GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit* (OSANG Healthcare) em formato *multiplex*, com iniciadores e sondas específicas para

os genes: N (nucleocapsídeo), E (envelope), RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) e Controle Interno (RNase P). Para o preparo da reação foi utilizado 10 µL de COVID-19 *Plus Reaction Mixture*, 5 µL de COVID-19 *Plus Probe Mixture* e 5 µL de RNA, com volume final da reação de 20 µL distribuídos em placa óptica de 96 poços. Os seguintes ciclos e temperaturas para a amplificação foram utilizados: 50°C por 20 minutos para transcrição reversa, seguidos por 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de: 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto para PCR, totalizando 115 minutos de reação. Em todas as reações foram adicionados controles negativos e positivos para validação dos resultados. As reações foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems 7500*.

#### **3.4.5 Estudo prospectivo de RNA-SARS-CoV-2 em plasma de doadores de sangue**

Foram selecionados 323 doadores de sangue que realizaram a doação no período de outubro de 2020 a abril de 2021 para realização do teste molecular para detecção do SARS-CoV-2 em amostras de plasma e *buffy coat*. Inicialmente, amostras de sangue total foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos e, com auxílio de uma pipeta *pasteur*, o plasma e o *buffy coat* foram coletados e armazenados em tubos eppendorf de 1,5 mL. O RNA foi extraído conforme descrito no item 3.4.1 (método automatizado). Para a amplificação do material genético, utilizamos o protocolo descrito no item 3.4.4 (método comercial).

#### **3.4.6 Estudo retrospectivo de RNA-SARS-CoV-2 em plasma de doadores de sangue**

Selecionamos 358 amostras de plasma para esta análise, referentes a doadores de sangue que realizaram doação entre dezembro de 2021 e janeiro de 2022. Para realizarmos o teste molecular de RT-PCR, o RNA foi extraído conforme descrito no item 3.4.1 (método automatizado). Para a amplificação do material genético, utilizamos o protocolo descrito no item 3.4.4 (método comercial).

#### **3.4.7 Estudo retrospectivo em doadores de sangue com informação pós-doação (PDI)**

Selecionamos 43 doadores de sangue que relataram a presença de sintomas característicos da COVID-19 até 15 após a doação de sangue no período de 2020 a 2022. As amostras foram coletadas da bolsa de plasma congelado resultante da doação de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto e suas unidades. Para realizarmos o teste molecular de RT-PCR, o RNA foi extraído conforme descrito no item 3.4.1 (método automatizado). Para a amplificação do material genético, utilizamos o protocolo descrito no item 3.4.4 (método comercial).

### 3.5 ANÁLISE DA REPLICAÇÃO VIRAL A PARTIR DE PLASMA POSITIVO PARA SARS-COV-2

Para investigar a possibilidade do SARS-CoV-2 replicar-se a partir do plasma humano, foram selecionadas três amostras de plasma para isolamento viral em células Vero-CCL81. Estas amostras foram obtidas de pacientes internados em condição clínica grave de COVID-19, com resultado positivo no teste de detecção do SARS-CoV-2 pela técnica de RT-PCR em amostra de plasma de acordo aos critérios de interpretação estabelecidos pelo protocolo CDC (item 3.4.3). O isolamento viral em amostras de plasma sanguíneo e avaliação do potencial de replicação foi realizado conforme descrito por ARAÚJO e colaboradores (2020). Estes experimentos foram realizados em colaboração com Prof. Dr. Edison Durigon do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O cultivo foi realizado utilizando o meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (do inglês, *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Vitrocell Embriolife) em estufa a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar úmido. Primeiramente, as células foram inoculadas em frasco T 25 cm<sup>2</sup> (Greiner) a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL. As células foram cultivadas por 24 horas e, posteriormente, a monocamada foi lavada três vezes com meio DMEM livre de soro. O volume de 500 µL das amostras de plasma foi adicionado sobre a cultura de células e incubado durante 1 hora. Em seguida, o volume foi completado para 5 mL com DMEM suplementado com 2,5% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. Este cultivo foi feito por até 72 horas para análise de efeito citopático (CPE). O sobrenadante foi coletado a cada 24 horas para avaliar o potencial de replicação viral por RT-PCR e microscopia óptica.

### 3.6 ANÁLISE DA CARGA VIRAL EM AMOSTRAS DE PLASMA POSITIVAS PARA SARS-COV-2

A quantificação absoluta da carga viral por RT-PCR foi realizada utilizando um material de referência, para definir os melhores parâmetros de sensibilidade analítica e dos limites de detecção dos ensaios de amplificação de testes de ácido nucléico (NAT) para SARS-CoV-2. O padrão utilizado trata-se de um isolado de vírus inativado da Inglaterra/02/2020 do *First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA*, comercializado pelo *National Institute for Biological Standards and Control*, Reino Unido- NIBSC code:20/146. Este padrão foi preparado para conter  $1 \times 10^8$  genomas de SARS-CoV-2 por mL e, após reconstituído em 0,5 mL de água ultrapura, obteve-se a concentração final de  $7,70 \text{ Log}^{10} \text{ UI/ml}$ , conforme recomendação do fabricante.

Inicialmente, foi realizada a construção de uma curva padrão para quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma. A extração do padrão foi realizada utilizando o método manual Qiamp Viral Mini kit (QIAGEN) (item 3.4.2). Em seguida, o RNA foi então quantificado em  $\text{ng}/\mu\text{L}$  através de um espectrofotômetro (NanoVue Plus - Healthcare Life Sciences). O número absoluto de cópias de RNA foi inferido a partir do cálculo da constante de Avogadro. Após quantificação do RNA, o material foi diluído em água nuclease *free*, com diluição em série por 10 vezes até o número de 314 cópias de RNA. Para a amplificação, utilizamos os conjuntos de iniciadores e sondas para os ensaios de RT-PCR em formato *singleplex* (protocolo CDC e como alvo a região N2 do nucleocapsídeo) e *multiplex* (protocolo GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit e como alvo o gene N - nucleocapsídeo) descritos nos itens 3.4.3 e 3.4.4, além de 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição do padrão. v) Os dados de execução foram analisados com o software SDS v2.4 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e o limite do ciclo (Ct, do inglês *cycle threshold*) foi calculado como a interseção entre uma curva de amplificação e a linha de base do sinal de fundo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTUDO RETROSPECTIVO - AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA (ANTI-IGG SARS-COV-2) EM DOADORES DE SANGUE NO ANO DE 2020

Durante o ano de 2020, o estudo avaliou uma amostragem representativa de 4,7% (646/13.824) do total de doações no ano de 2020. As análises sorológicas representam até 14,30% do número de doações de sangue realizadas no Hemocentro (sede) durante o ano de 2020 (143/999 no mês de janeiro). Os resultados sorológicos reagentes representam até 25,71% (9/35 no mês de setembro) do ensaio sorológico e até 0,78% (9/1145 no mês de setembro) das doações de sangue no ano de 2020 (Tabela 1).

**Tabela 1** – Percentual de amostras de doadores de sangue submetidas à detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente ao número total de doações de sangue realizadas no Hemocentro de Ribeirão Preto (sede), mês a mês, no ano de 2020.

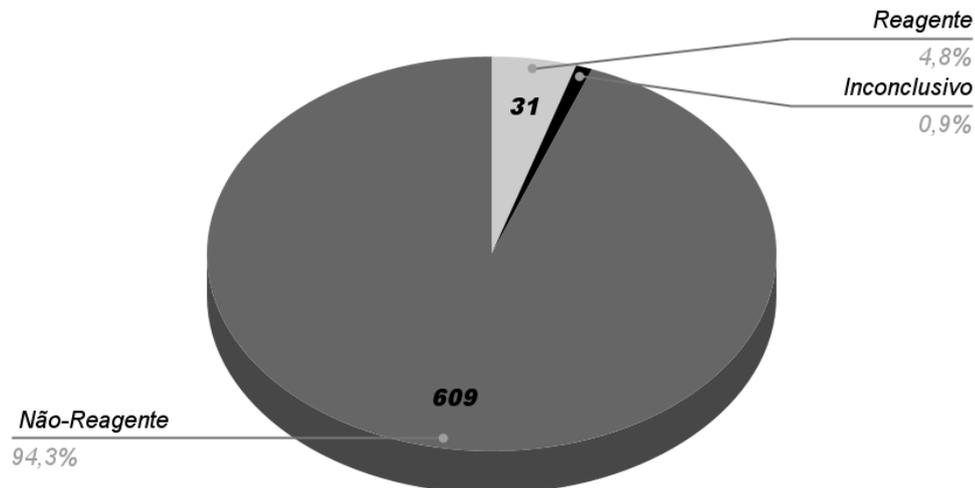
Meses	Doações de sangue	Testes de sorologia realizados		Sorologia IgG reagentes		% sorologia IgG/n <sup>o</sup> doações
		n	% (por doações de sangue)	n	% (por testes realizados)	
Janeiro	999	143	14,30	1	0,69	0,10
Fevereiro	1373	60	4,36	0	0,00	0,00
Março	1455	55	3,78	0	0,00	0,00
Abril	1095	33	3,01	1	0,69	0,09
Maiο	953	47	4,93	5	3,03	0,52
Junho	1253	42	3,35	1	2,38	0,07
Julho	1213	40	3,29	0	0	0
Agosto	979	78	7,96	5	6,41	0,51
Setembro	1145	35	3,05	9	25,71	0,78
Outubro	1174	31	2,64	4	12,9	0,34
Novembro	1196	46	3,84	3	6,52	0,25
Dezembro	989	36	3,64	2	5,55	0,2

Na Tabela 1, apresentamos o percentual de amostras de doadores de sangue submetidas ao teste sorológico para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 frente ao número total de doações de sangue realizadas no Hemocentro de Ribeirão Preto (sede), mês a mês, no ano de 2020. \*% de testes: Percentual de testes realizados. Fonte: O próprio autor.

Trinta e uma das 646 amostras de plasma apresentaram resultados reagentes, o que representa uma taxa de positividade de 4,8%. Por outro lado, 609 das 646 amostras de plasma mostraram resultados não reagentes, totalizando 94,3%. Seis

(0,9%) amostras foram classificadas como inconclusivas devido aos valores obtidos no cálculo da razão de densidade óptica (DO) na leitura da absorbância (Figura 1).

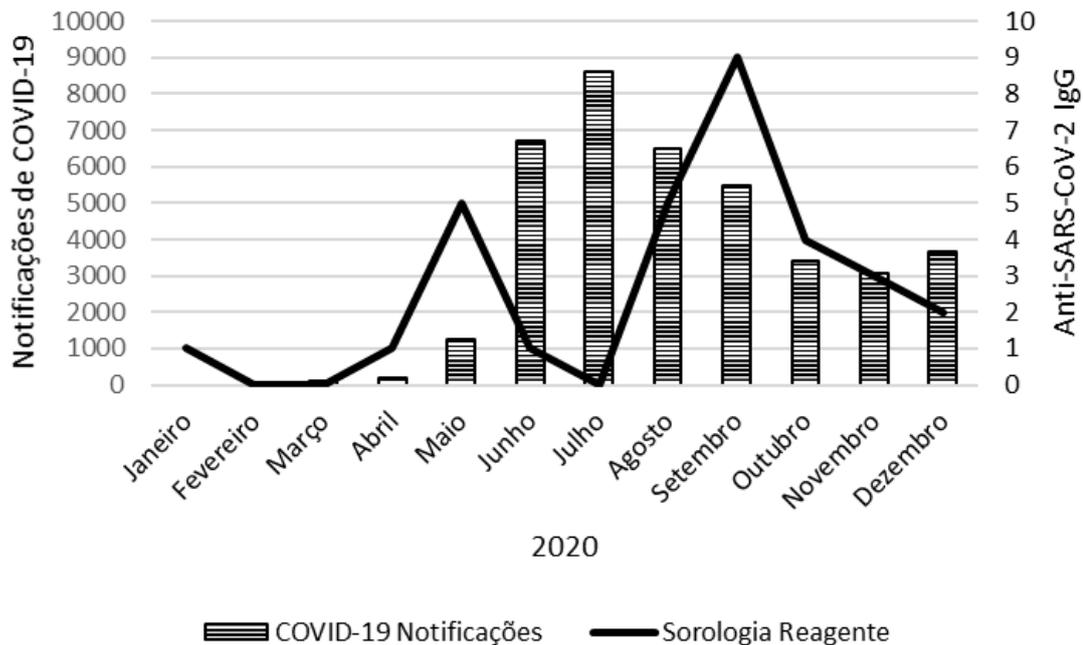
**Figura 1** – Gráfico de setores indicando a soroprevalência de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em doadores de sangue no ano de 2020.



A figura 1 apresenta os resultados da análise sorológica para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto (sede) no ano de 2020. Dentre os resultados, destacados na figura pela cor cinza-claro, 4,8% apresentaram resultados reagentes (n= 31), e 94,3% representam o número de amostras que apresentaram o resultado não-reagente (n= 609, destacados pela cor cinza-escuro). Os resultados interpretados como inconclusivos estão representados pela cor preta (n= 6) e representam 0,9%. Fonte: O próprio autor.

Observamos que o primeiro caso notificado na cidade de Ribeirão Preto ocorreu em março de 2020, assim como os casos de COVID-19 notificados por meio de diagnóstico molecular em amostras de *swab* nasofaríngeo. Neste ano, o número de casos aumentou gradativamente, atingindo o pico em julho, conforme relatado pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto (Secretaria Municipal de Saúde, 2020) (Figura 2).

**Figura 2** – Distribuição do número de casos de COVID-19 notificados pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto no ano de 2020 e a soroprevalência observada em doadores de sangue no mesmo período.



Na figura 2, o gráfico apresenta em barras listradas o número de casos notificados pela secretaria municipal de saúde em cada mês do ano de 2020 na cidade de Ribeirão Preto. O primeiro caso foi notificado em março de 2020. A linha em cor preta representa a contagem de resultados reagentes, conforme o mês, no teste sorológico anti-SARS-CoV-2-IgG de doadores de sangue que realizaram a doação no ano de 2020 no Hemocentro de Ribeirão Preto. Fonte: O próprio autor.

## 4.2 DETECÇÃO DO RNA DE SARS-COV-2 EM PLASMA DE DOADORES DE SANGUE

A análise de detecção molecular de RNA-SARS-CoV-2 foi conduzida em duas etapas: estudo prospectivo com 323 amostras analisadas e estudo retrospectivo com 358 amostras analisadas. Foram analisadas 681 amostras de plasma de candidatos aptos à doação. A seguir, estão apresentados os resultados dos estudos.

### 4.2.1 Estudo prospectivo em doadores de sangue

A detecção de RNA de SARS-CoV-2 no estudo prospectivo foi realizada em 323 amostras de plasma e *buffy coat*, referentes a doadores que realizaram a doação de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto (sede) entre outubro de 2020 a abril de 2021.

A reação de RT-PCR *multiplex*, tinha os seguintes alvos: E gene: proteína do envelope; N gene: proteína do nucleocapsídeo; RdRp gene: RNA polimerase dependente de RNA; IC: controle interno (RNase P). Conforme os resultados obtidos

nesta análise, não houve presença de amplificação dos alvos nesta reação (Tabela 2). É importante ressaltar que todas as amostras apresentaram amplificação do IC: controle interno (RNase P), o que valida o processo de extração e amplificação. O valor médio do Ct para o IC foi de 33,55 nas amostras de plasma e 26,48 nas amostras de *buffy coat*.

**Tabela 2** – Valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes virais E, N, RdRp e RNase P resultantes da detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR no plasma e no *buffy coat* de doadores de sangue, no período de outubro de 2020 a abril de 2021.

Nº de Doadores	Detecção de SARS-CoV-2 em RT-PCR							
	plasma (Ct médio)				<i>buffy coat</i> (Ct médio)			
	E gene	N gene	RdRp	IC	E gene	N gene	RdRp	IC
<b>323</b>	Indetectável	Indetectável	Indetectável	33,55	Indetectável	Indetectável	Indetectável	26,48

Na Tabela 2, apresentamos os resultados observados na detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR, do estudo prospectivo, onde os alvos são: E gene: proteína do envelope; N gene: proteína do nucleocapsídeo; RdRp gene: RNA polimerase dependente de RNA; IC: controle interno (RNase P). \*Ct: limiar do ciclo. Fonte: O próprio autor.

#### 4.2.2 Estudo retrospectivo em doadores de sangue

A detecção de RNA de SARS-CoV-2 no estudo retrospectivo foi realizada em 358 amostras de plasma de doadores de sangue. Estes doadores realizaram a doação de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto (sede) no período de dezembro de 2021 a janeiro de 2022.

Nesta análise de detecção *multiplex*, com os mesmos alvos analisados no item anterior, os resultados observados neste grupo de amostras mostraram uma positividade de 3,07% (11/358), com valores de Ct entre 24,85 a 39,92 (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes virais E gene, N gene, RdRp e do IC: controle interno (RNase P), resultantes da detecção molecular em 11 doadores de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto, no período de dezembro de 2021 a janeiro de 2022.

<b>Protocolo <i>GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit</i></b>					
<b>Doadores</b>	<b>IC</b>	<b>E gene</b>	<b>N gene</b>	<b>RdRp</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	34,94	Indetectável	39,59	Indetectável	Positivo
<b>2</b>	35	Indetectável	39,66	Indetectável	Positivo
<b>3</b>	35,02	Indetectável	39,65	Indetectável	Positivo
<b>4</b>	31,2	Indetectável	Indetectável	35,65	Positivo
<b>5</b>	32,96	41,68	42,45	32,48	Positivo
<b>6</b>	33,56	Indetectável	Indetectável	32,9	Positivo
<b>7</b>	32,27	Indetectável	37,19	39,92	Positivo
<b>8</b>	30,54	Indetectável	Indetectável	28,76	Positivo
<b>9</b>	32,4	Indetectável	Indetectável	32,62	Positivo
<b>10</b>	33,41	Indetectável	39,71	Indetectável	Positivo
<b>11</b>	27,05	29,01	Indetectável	24,85	Positivo

A tabela 3 apresenta os resultados da detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR, do estudo retrospectivo, onde os alvos são: E gene: proteína do envelope; N gene: proteína do nucleocapsídeo; RdRp gene: RNA polimerase dependente de RNA; IC: controle interno (RNase P). \*Ct: limiar do ciclo. Fonte: O próprio autor.

A interpretação dos resultados do ensaio *multiplex* está baseada no valor de Ct obtido na reação. O resultado é considerado positivo quando apresenta valor de Ct inferior a 40 em pelo menos um dos genes virais e com valor de Ct inferior a 35 no IC: controle interno.

Com o objetivo de confirmar a positividade dos resultados do teste *multiplex*, realizamos também o ensaio com detecção *singleplex* - *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), onde os alvos são: N1 gene: região N1 da proteína do nucleocapsídeo; N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo e IC: controle interno (RNase P). Nesta análise, a positividade foi de 1,4 % (5/358), onde os valores de Ct observados apresentaram-se entre 32,78 a 36,34 (Tabela 4).

**Tabela 4** – Valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes virais N1, N2 e do controle interno (IC) RNase P resultantes da detecção molecular em 5 doadores de sangue no Hemocentro de Ribeirão Preto, utilizando protocolo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC).

<b>Protocolo <i>Center for Disease Control and Prevention</i> (CDC)</b>				
<b>Doadores</b>	<b>IC</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	31,81	32,78	35,93	Positivo
<b>2</b>	32,1	34,79	36,34	Positivo
<b>3</b>	31,77	33,71	33,58	Positivo
<b>4</b>	30,07	34,45	Indetectável	Positivo
<b>5</b>	32,34	33,27	Indetectável	Positivo

A tabela 4 apresenta os resultados da detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR, do estudo retrospectivo, onde os alvos são: N1 gene: região N1 da proteína do nucleocapsídeo; N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo; IC: controle interno (RNase P). \*Ct: limiar do ciclo. Fonte: O próprio autor.

As condições para interpretação dos resultados utilizando este ensaio *singleplex* está baseada no valor Ct obtido na reação. E assim como no protocolo mencionado anteriormente, neste protocolo, um resultado positivo é definido quando o valor Ct apresenta-se inferior a 40 em pelo menos um dos genes virais e inferior a 35 na análise do IC: controle interno. Esta interpretação também inclui a presença de uma curva de amplificação sigmoideal nos alvos detectados.

#### **4.2.3 Estudo retrospectivo em doadores de sangue com informação pós-doação (PDI)**

A detecção do RNA de SARS-CoV-2 foi realizada em 43 amostras de plasma de doadores de sangue que relataram a presença de sintomas característicos da COVID-19 até 15 após a doação de sangue, entre agosto de 2020 a maio de 2021. Não houve detecção dos alvos de SARS-CoV-2 nas amostras analisadas (Tabela 5). É importante ressaltar que todas as amostras apresentaram amplificação do IC, o que valida o processo de extração e amplificação. O valor médio do Ct para o IC foi de 32,87 (Tabela 5).

**Tabela 5** – Valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes virais E gene, N gene, RdRp e do IC: controle interno (RNase P), relativo ao estudo retrospectivo de SARS-CoV-2 no plasma de doadores de sangue com informação pós-doação no Hemocentro de Ribeirão Preto.

<b>Detecção de SARS-CoV-2 em RT-PCR - plasma (Ct médio)</b>				
<b>Nº de Doadores</b>	<b>E gene</b>	<b>N gene</b>	<b>RdRp</b>	<b>IC</b>
<b>43</b>	Indetectável	Indetectável	Indetectável	32,87

A tabela 5 apresenta os resultados observados na detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR, do estudo retrospectivo, onde os alvos são: E gene: proteína do envelope; N gene: proteína do nucleocapsídeo; RdPd gene: RNA polimerase dependente de RNA; IC: controle interno - RNase P. \*Ct: limiar do ciclo. Fonte: O próprio autor.

#### 4.3 ANÁLISE DA REPLICAÇÃO VIRAL DE SARS-COV-2 A PARTIR DE AMOSTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO

O isolamento do SARS-CoV-2 foi avaliado em três amostras de plasma de indivíduos infectados usando uma metodologia similar ao estudo realizado por Cappy e colaboradores (2020). As amostras de plasma foram obtidas de pacientes internados em estado clínico grave com infecção por SARS-CoV-2, e foram coletadas em novembro de 2020.

Antes de realizar o isolamento em culturas de células, para confirmar a positividade das amostras, realizamos a detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR. As amostras apresentaram valores de Ct entre 33,47 e 36,96 para os alvos de SARS-CoV-2 e valores de Ct abaixo de 30 para o alvo IC (Tabela 6).

**Tabela 6** – Valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes virais N1, N2 e do controle interno (IC) RNase P das amostras de plasma sanguíneo de indivíduos infectados com SARS-CoV-2, cultivadas em células de linhagem Vero-CCL81.

<b>Detecção de SARS-CoV-2 em RT-PCR - plasma (Ct)</b>			
<b>Amostra</b>	<b>N1 gene</b>	<b>N2 gene</b>	<b>RNase P</b>
<b>1</b>	33,47	36,96	24,31
<b>2</b>	35,89	35,82	28,54
<b>3</b>	33,71	34,87	27,98

A tabela 6 apresenta os resultados observados na detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR das amostras submetidas ao estudo de potencial de replicação viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma, onde os alvos são: N1 gene: região N1 da proteína do nucleocapsídeo; N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo; IC: controle interno (RNase P). \*Ct: limiar do ciclo. Fonte: O próprio autor.

Estas amostras de plasma foram submetidas ao cultivo em células de linhagem Vero-CCL81 e, em cada passagem, foram mantidas por cinco dias em meio DMEM com alta glicose e ambiente com CO<sub>2</sub>. Embora não houvesse evidência de efeito citopático, foram realizadas mais três passagens (T0, T1 e T2) e nova inoculação. Ao final, uma reação de RT-PCR foi realizada e, embora os resultados apresentaram valores de Ct acima de 37,99, o resultado foi negativo para SARS-CoV-2. A análise por microscopia óptica também foi realizada e não foi observada lise celular, uma vez que as células mantiveram-se intactas (Figura 3).

**Figura 3** – Análise por microscopia óptica para investigar a presença de efeito citopático em células Vero-CCL81 cultivadas com amostras de plasma positivas para SARS-CoV-2.



A figura 3 apresenta a microscopia óptica da linha celular Vero CCL81, após T0, T1 e T2 pós-inoculação, mostrando a ausência de efeitos citopáticos causados pelo SARS-CoV-2 a partir das amostras de plasma de 3 pacientes positivos para SARS-CoV-2, representadas pelas figuras A, B e C. Ampliações originais 100X. Fonte: O próprio autor.

#### 4.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE DA CARGA VIRAL DE SARS-COV-2

A determinação da carga viral das amostras de plasma positivas nos ensaios de RT-PCR foi realizada com auxílio do padrão internacional *First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA* (NIBSC code:20/146), um isolado de vírus inativado da Inglaterra/02/2020. Este padrão foi utilizado na construção de uma curva padrão de amplificação, onde o valor de Ct está inversamente relacionado à concentração do RNA viral na amostra clínica.

A curva padrão utilizada para calcular a carga viral foi construída a partir de uma concentração de  $3,1 \times 10^9$  cópias/ $\mu$ L. Os valores de Ct para cada concentração foram determinados em duplicata, utilizando dois kits diferentes para detecção. Em um dos ensaios realizados utilizamos o conjunto de *primers* e sonda do kit comercial *GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp*, preparado para reações em formato *multiplex*. O alvo escolhido deste kit foi o N gene: proteína do nucleocapsídeo. Para o

outro ensaio realizado, utilizamos o conjunto de *primers* e sonda do CDC para reações em formato *singleplex*. Os alvos escolhidos deste ensaio são o N1 gene: região N1 da proteína do nucleocapsídeo e N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo. Em ambas as curvas, a sensibilidade de detecção foi de até  $3,14 \times 10^4$  cópias/ $\mu\text{L}$ , com valor de Ct até 40,21 (Tabela 7).

**Tabela 7** – Valores de *cycle threshold* (Ct) obtidos a partir da diluição seriada do Padrão Internacional para o RNA de SARS-CoV-2 da Organização Mundial de Saúde (código NIBSC: 20/146) por RT-PCR em tempo real.

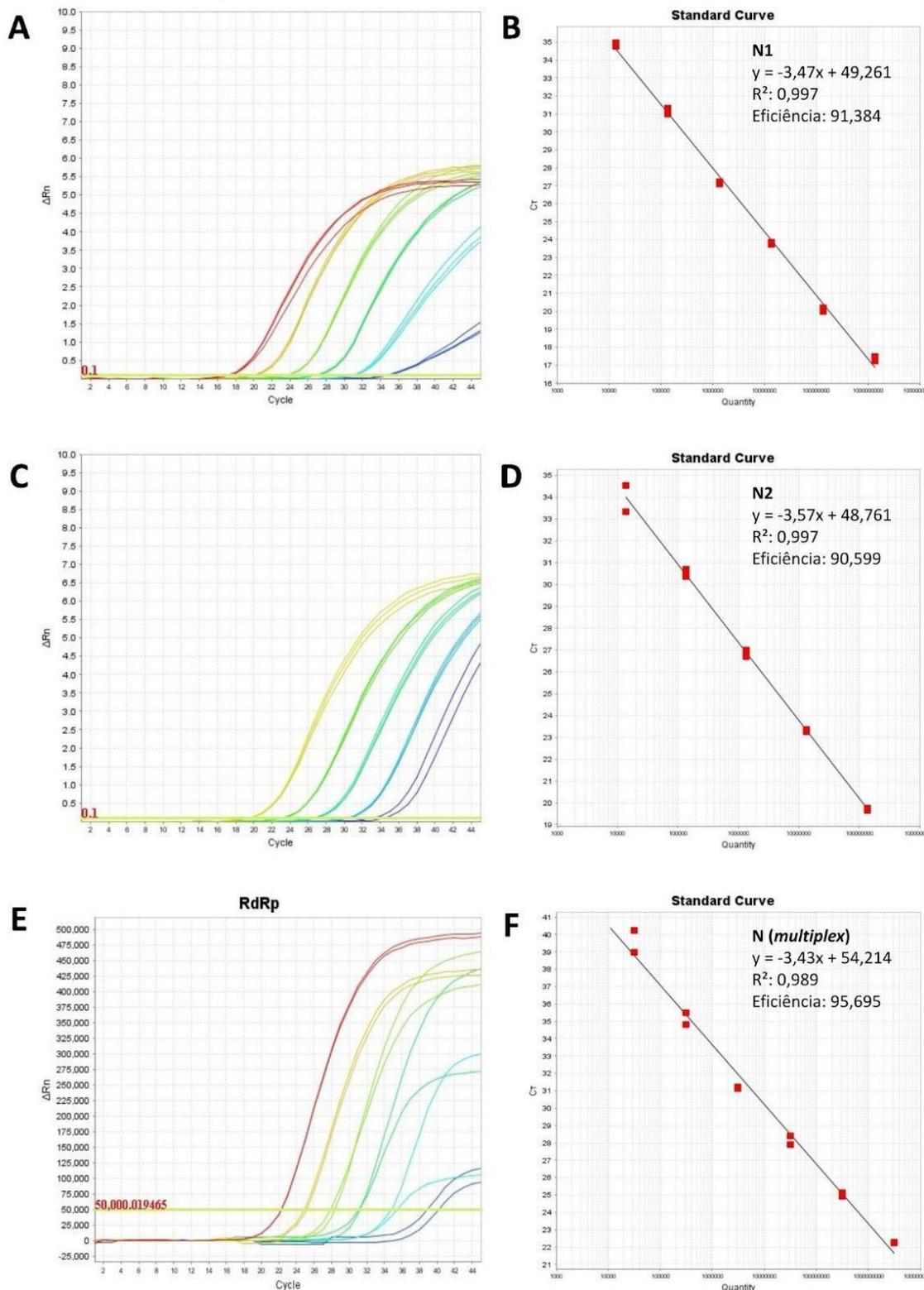
<b>GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit</b>			<b>Center for Disease Control and Prevention (CDC)</b>					
<b>Gene alvo: nucleocapsídeo (N)</b>			<b>Gene alvo: região N1 do nucleocapsídeo</b>			<b>Gene alvo: região N2 do nucleocapsídeo</b>		
<b>Diluição</b>	<b>cópias/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Ct</b>	<b>Diluição</b>	<b>cópias/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Ct</b>	<b>Diluição</b>	<b>cópias/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Ct</b>
1 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^9$	22,25	1 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^9$	17,31	1 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^8$	17,49
2 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^8$	24,90	2 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^8$	20,13	2 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^7$	20,86
3 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^7$	28,39	3 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^7$	23,76	3 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^6$	25,12
4 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^6$	31,14	4 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^6$	27,30	4 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^5$	29,17
5 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^5$	35,48	5 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^5$	31,14	5 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^4$	33,40
6 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^4$	40,21	6 <sup>o</sup>	$3,1 \times 10^4$	34,86			

A Tabela 7 apresenta a validação da curva padrão utilizando o Padrão Internacional para o RNA de SARS-CoV-2 da Organização Mundial de Saúde (código NIBSC: 20/146) para quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 por RT-PCR. A diluição seriada do padrão foi realizada a partir do número de cópias virais/ $\mu\text{L}$  calculadas a partir da concentração de RNA. Para esta validação utilizamos dois ensaios: i) protocolo *GeneFinder™ COVID-19 plus RealAmp Kit* (OSANG Healthcare) com escolha do seguinte alvo: N gene: proteína do nucleocapsídeo. ii) protocolo CDC, onde os alvos são: N1 gene: região N1 da proteína do nucleocapsídeo; N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo; IC: controle interno (RNAse P). \*\*Ct: limiar do ciclo. \*\*\*cópias/ $\mu\text{L}$ : número de cópias genômicas virais por microlitro. Fonte: O próprio autor.

A reta de regressão linear das curvas padrão para os genes analisados apresentaram os seguintes parâmetros: *slope*: correspondente à eficiência de amplificação da reação de PCR com base na inclinação da reta, apresentou valores: -3,47, -3,57 e -3,43 para os genes N, N1 e N2, respectivamente. Já o parâmetro *Y-intercept*, que corresponde ao limite teórico de detecção da reação, variou entre 49,26 e 48,76 para o ensaio *singleplex* e 54,21 para o ensaio *multiplex*. Na análise do parâmetro de coeficiente de correlação ( $R^2$ ), para medir a linearidade da curva, houve uma oscilação de 0,998 e 0,989. A Eficiência de amplificação para os conjuntos de *primers* e sonda analisados nos dois protocolos apresentou um percentual de 90,59% a 95,69% (Figura 4). Após avaliar a performance dos ensaios, seguimos com o ensaio

específico para o alvo N2 da proteína do nucleocapsídeo, por apresentar melhor reprodutibilidade.

**Figura 4** – Representação gráfica das curvas de amplificação e da curva validadas para a análise de carga viral de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real.



A figura 4 apresenta as seguintes análises: (A, C, E) curva de amplificação das diluições em série (de  $3,19 \times 10^9$  a  $3,19 \times 10^4$  cópias/ $\mu\text{L}$ ) do padrão utilizado no ensaio com os alvos N1, N2 e N da proteína

do nucleocapsídeo, respectivamente. O eixo y representa a intensidade de fluorescência ( $\Delta Rn$ ) e o eixo x o cycle threshold (Ct) de cada diluição. (B, D, F) curva padrão construída pelos valores de Ct (eixo y) e valor de cópias/ $\mu$ L (eixo x) de acordo com os parâmetros de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) dos alvos N1, N2 e N da proteína do nucleocapsídeo, respectivamente. \*Ct: limiar de ciclo. \*\* cópias/ $\mu$ L: cópias genômicas virais por microlitro. Fonte: O próprio autor.

#### 4.4.1 Análise da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma sanguíneo

O cálculo do número de cópias genômicas de SARS-CoV-2 (cópias/ $\mu$ L) foi realizado em cinco amostras de plasma de doadores de sangue assintomáticos (amostras B-F) e em uma amostra de plasma de paciente internado por COVID-19 (amostra A). As amostras apresentaram um número de cópias/ $\mu$ L entre  $5,1 \times 10^3$  e  $4,1 \times 10^5$ , com média  $9,3 \times 10^4$ , desvio padrão de  $\pm 1,6 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L e valores de Ct entre 28,73 e 36,38 (Tabela 8).

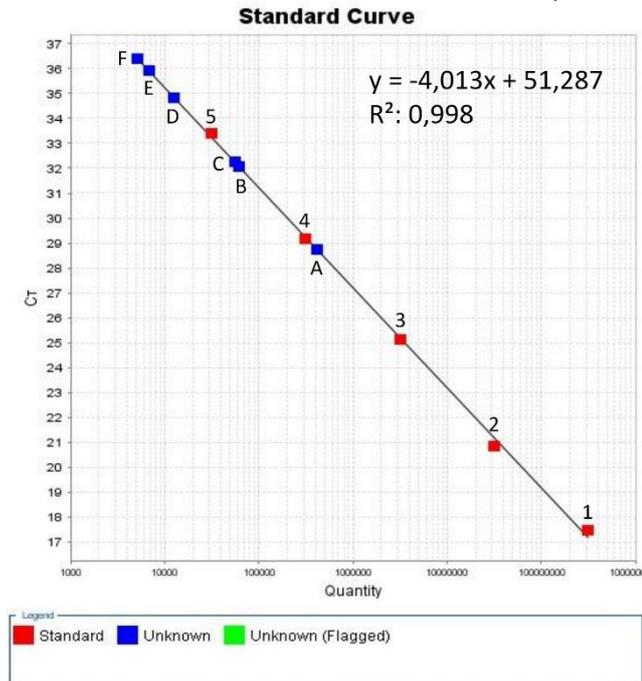
**Tabela 8** – Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de plasma de doadores de sangue utilizando alvo N2.

Quantificação da carga viral		
Amostra	cópias/ $\mu$ L	Ct
A	$4,1 \times 10^5$	28,73
B	$6,2 \times 10^4$	32,05
C	$5,5 \times 10^4$	32,24
D	$1,2 \times 10^4$	34,83
E	$6,7 \times 10^3$	35,92
F	$5,1 \times 10^3$	36,38

A Tabela 8 apresenta o valor obtido na quantificação da carga viral das amostras de plasma com níveis detectáveis do RNA de SARS-CoV-2. Este ensaio utilizou como alvo N2 gene: região N2 da proteína do nucleocapsídeo. Entre estas amostras, está a amostra A, que pertence a um paciente internado com COVID-19, e cinco amostras de plasma de doadores de sangue (B, C, D, E e F). \*cópias/ $\mu$ L: cópias genômicas de SARS-CoV-2 por microlitro. \*\* Ct: limiar de ciclo. Fonte: O próprio autor.

Estes dados se aproximam dos seguintes pontos de diluição da curva padrão: 4º ponto de diluição ( $3,149 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L) e 5º ponto de diluição ( $3,149 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L), conforme demonstra a figura 5.

**Figura 5** – Curva padrão utilizada para a quantificação da carga viral de amostras de plasma com positividade molecular de RNA de SARS-CoV-2 utilizando protocolo *singleplex*.



A figura 5 apresenta a curva padrão utilizando como alvo a região N2 da proteína do nucleocapsídeo. Esta curva foi construída pelo valor de Ct (eixo y) e o número de cópias por microlitro (cópias/μL) do padrão internacional (eixo x). Os pontos de diluição estão simbolizados e enumerados em pontos de cor vermelha. Os números de cópias/μL estão distribuídos nos seguintes pontos: O 1º ponto apresenta  $3,1 \times 10^8$  cópias/μL; o 2º ponto apresenta  $3,1 \times 10^7$  cópias/μL; o 3º ponto, apresenta  $3,1 \times 10^6$  cópias/μL; o 4º ponto apresenta  $3,1 \times 10^5$  cópias/μL e por fim, o 5º ponto de diluição apresenta  $3,1 \times 10^4$  cópias/μL. As letras A, B, C, D, E e F representam a posição das amostras de plasmas citadas na tabela 8. Os parâmetros de análise desta curva também estão mostrados na figura: Slope= -4,013; Y-Intercept= 51,287;  $R^2= 0,998$ . Slope: inclinação da reta; Y-Intercept: limite teórico de detecção aceitável;  $R^2$ : Coeficiente de correlação; Standard: pontos da curva padrão; Unknown: pontos representando as amostras de plasma. Fonte: O próprio autor.

A reação com alvo no N2 gene, apresentou número de cópias genômicas de SARS-Cov-2 inferior a  $4,1 \times 10^5$  cópias/μL com detecção mínima de 5.180 cópias/μL. O maior número de cópias quantificadas nesta reação foi de 419.000 cópias/μL (e valor de Ct 29,0), pertence a uma amostra de paciente sintomático grave e positivo para SARS-CoV-2. Enquanto todas as cinco amostras restantes, referente a amostras de plasmas de doadores de sangue assintomáticos, apresentaram um número inferior a 62.300 cópias/μL (e valor de Ct acima de 32,0) de RNA de SARS-CoV-2.

## 5 DISCUSSÃO

A segurança transfusional em um cenário de pandemia é de alta relevância, especialmente quando se trata de um vírus emergente. Para exemplificar, temos a pandemia desencadeada pelo HIV, no início da década de 1980. Este vírus inicialmente desconhecido apresentou capacidade de transmissão transfusional em doadores de sangue inicialmente assintomáticos (*Centers for Disease Control and Prevention*, 1982). Os testes moleculares para detecção de material genético viral (denominados como Testes de ácido nucleico - NAT), foram implantados pelos Estados Unidos (EUA), em meados de 1999, para detectar os doadores de sangue positivos e diminuir o risco de transmissão transfusional. Este cuidado reduziu a chance de transmissão transfusional, assim como protegeu a saúde fragilizada dos pacientes que receberam os hemocomponentes (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2010).

Os pacientes infectados por SARS-CoV-2 podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, desde a ausência de sintomas até doenças críticas (NIH, 2023). As infecções assintomáticas referem-se àquelas com detecção do RNA de SARS-CoV-2 por meio de diagnóstico molecular em amostras clínicas e ausência de sintomas ou sinais clínicos. Diversos estudos demonstram que a infecciosidade de um indivíduo assintomático e sintomático pode ser equivalente, e o diagnóstico precoce auxilia na prevenção e no controle da transmissão da COVID-19 (LAI et al., 2020; CHEN et al., 2020). Assim, os indivíduos assintomáticos têm um papel fundamental na disseminação viral e por isso representam um possível impacto na segurança transfusional.

Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2, o risco de transmissão transfusional apresentou-se como desconhecido. A pandemia da COVID-19 trouxe grandes desafios para o banco de sangue. Dentre eles estão: à disposição dos candidatos à doação voluntária de sangue em meio ao cenário epidemiológico e a identificação do doador de sangue quando infectado por SARS-CoV-2 em condição assintomática (TO et al., 2020).

Este estudo analisou a prevalência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em doadores de sangue e a presença de RNA do SARS-CoV-2 no plasma de candidatos voluntários à doação de sangue. Além disso, foi avaliada a carga viral no plasma e a capacidade de replicação do vírus a partir do plasma. Os resultados apontam que a

triagem de doadores de sangue para o SARS-CoV-2 não se faz necessária, uma vez que não foi identificado viremia no plasma com capacidade de replicação viral.

## 5.1 AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA IGG EM DOADORES DE SANGUE

Em nosso estudo, a avaliação da soroprevalência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG em doadores de sangue revelou um índice de 4,79% (31/646). Em estudos de soroprevalência em doadores de sangue de países europeus e dos Estados Unidos, a detecção de anti-SARS-CoV-2 IgG mostra taxas de soroprevalência similares: 0,91% na Alemanha, 1,7% na Dinamarca, 2,7% na Holanda, 0,1% nos Estados Unidos, 4 a 5,2% na Itália e 13% no Reino Unido. As análises foram realizadas no mesmo período, e o número de amostras variou entre 790 a 24.000 amostras (FISCHER; KNABBE; VOLLMER, 2020; AMIRTHALINGAM et al., 2021; SLOT et al., 2020; KASPERSEN et al., 2022; NG et al., 2020; VALENTI et al., 2021).

No Brasil, a pandemia da COVID-19 iniciou-se no início de 2020 e evoluiu consideravelmente, com 7.465.806 casos confirmados por todo o país neste mesmo ano (Ministério da Saúde, 2020). A cidade de Ribeirão Preto, localizada no interior do estado de São Paulo, confirmou 38.985 casos neste mesmo período, sendo o seu primeiro caso de COVID-19 confirmado em 12 de março de 2020, que se tratava de um indivíduo que havia retornado de uma viagem aos Estados Unidos (Secretaria Municipal da Saúde, 2020). Desde o início da pandemia, o Brasil adotava medidas sanitárias para controle do contágio do vírus, como o isolamento e distanciamento social, com a suspensão de atividades não essenciais e restrição de circulação de pessoas, denominado *lockdown* (Conselho Nacional de Saúde, 2020).

No período de fevereiro a julho de 2020, o Brasil transitava na primeira onda de casos notificados. O período entre novembro de 2020 a abril de 2021, considerado da segunda onda, foi o mais longo e letal (MOURA et al., 2022). Nos resultados do estudo de soroprevalência em doadores, observamos que os meses com maiores taxas na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG são referentes aos meses de agosto, setembro e dezembro de 2020.

Observamos que houve detecção de anti-SARS-CoV-2 IgG em uma amostra referente ao mês de janeiro de 2020. Neste período, ainda não havia notificação de casos de COVID-19 no país. Outros autores também relataram a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG no Brasil no mesmo período utilizando

imunoensaios, mas permanecem incertos sobre a entrada do vírus antes do início das notificações, em fevereiro de 2020. Entre estes estudos, temos o estudo de Stringari e colaboradores (2021) que analisou 210 amostras de soro coletadas entre dezembro de 2019 e fevereiro de 2020 de indivíduos residentes no estado do Espírito Santo. Foi observada a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG em 7 amostras, sendo realizado uma segunda análise para confirmação destes resultados e exclusão da possibilidade de reação cruzada com outros coronavírus. O estudo de Zucherato e colaboradores (2022) também realizou um estudo no Hemocentro de Ribeirão Preto, assim como nosso estudo. Em 546 amostras de plasma de doadores de sangue analisadas, no período entre outubro e dezembro de 2019, observaram detecção de anti-SARS-CoV-2 IgG em seis amostras. No entanto, a confirmação das amostras utilizando outro método de detecção (quimioluminescência) apresentou resultados negativos em todas as amostras. Os imunoensaios utilizados para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG apresentam especificidade analítica para proteína S1 na família do coronavírus, porém, devido a estreita relação do SARS-CoV e do SARS-CoV-2, as reações cruzadas entre esses dois vírus são prováveis (Euroimmun, 2020).

Vale ressaltar que o nosso estudo apresenta dados de soroprevalência no período anterior ao início da cobertura vacinal no Brasil. Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2, a doença se espalhou para todos os continentes e, como medida para tentar conter a disseminação de COVID-19, houve a aceleração na produção de vacinas para uso emergencial. O Brasil recebeu autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso emergencial de vacinas em janeiro de 2021. E em fevereiro de 2021, as vacinas começaram a ser aplicadas na população brasileira (CASTRO, 2021; MOURA et al., 2022).

A imunidade natural contra o SARS-CoV-2 ocorre com a produção de anticorpos específicos e com a atividade de células T citotóxicas. Esta resposta é a responsável pela proteção do indivíduo durante a infecção (VILANOVA, 2020). Em indivíduos imunocompetentes, o tempo de durabilidade dos anticorpos produzidos por uma infecção natural de SARS-CoV-2 pode ser relativamente curto. Porém, em até 90% desses indivíduos os anticorpos IgG produzidos podem tornar-se persistentes, permitindo sua detecção no sangue. Além da detecção, também é possível a identificação dos doadores de sangue que estiveram infectadas no passado,

recuperadas de doenças e possivelmente imunes antes da doação de sangue (VABRET et al., 2020; SHEN et al., 2020).

O doador de sangue em condições assintomáticas ou subclínicas de uma doença pode apresentar-se como saudável durante a seleção, entrevista e triagem clínica e, portanto, não ser diagnosticado. O conhecimento sobre os casos assintomáticos de COVID-19 é essencial para descrever e interpretar as respostas epidêmicas locais, assim como identificar a proporção de doadores que já foi exposta ao vírus e desenvolveu anticorpos contra o SARS-CoV-2. E as amostras arquivadas de doadores de sangue são cada vez mais reconhecidas como de grande valor para monitorar retrospectivamente doenças infecciosas, especialmente doenças infecciosas emergentes (BUSCH et al., 2021; PIZZICHINI; PATINO; FERREIRA, 2020).

## 5.2 DETECÇÃO DE RNA-SARS-COV-2 EM PLASMA DE DOADORES DE SANGUE

O SARS-CoV-2 infecta principalmente células do sistema respiratório, mas este vírus também pode passar pela fase sanguínea para disseminação pelo organismo humano. Uma vez presente na corrente sanguínea, o RNA viral pode apresentar-se detectável em amostras de plasma (CHANG; YAN; WANG, 2020; GRANT; GARSON; TEDDER, 2003). A detecção de RNA de SARS-CoV-2 no sangue é denominada como RNAemia e pode ser detectada em indivíduos com diferentes quadro clínicos, incluindo assintomáticos (WANG et al., 2020; VEYER et al., 2020).

A avaliação do risco transfusional de um patógeno emergente envolve também a avaliação dos seguintes critérios: i) a capacidade do patógeno desenvolver a infecção em humanos e se espalhar dentro das populações, ii) o indivíduo infectado não apresentar manifestações clínicas em sua fase virêmica, iii) a capacidade do vírus em se manter intacto durante o processamento e armazenamento do sangue, iv) ser passível de transmissão por via intravenosa e (v) estar relacionado a uma doença que apresente quadro clínico característico de sua infecção em pacientes que receberam o hemocomponente (KIELY et al., 2017).

O nosso estudo observou uma positividade inicial de detecção de RNA-SARS-CoV-2 em 1,51% (11/724) amostras de plasma de doadores de sangue testadas. Como estes resultados apresentaram valor de Ct próximo ao limite de detecção do protocolo utilizado, aplicamos um segundo teste, e a partir da concordância entre os

dois testes, a positividade confirmada foi de 0,7% (5/724). No entanto, a detecção do material genético não significa necessariamente que o vírus viável esteja presente nas amostras, pois se trata de amostra de plasma sanguíneo e de uma infecção predominantemente respiratória (SHARFSTEIN; BECKER; MELLO, 2020; SULE; OLUWAYELU, 2020). Adicionalmente, não houve relato de informação pós-doação de nenhuma natureza destes doadores de sangue, sugerindo que os mesmos permaneceram assintomáticos. De acordo com Zheng e colaboradores (2020), no início da infecção por SARS-CoV-2, a partir da primeira semana, a carga de RNA viral nas amostras de soro está aumentada, e entra em declínio no início da terceira semana da doença. Este RNA viral quando detectado em amostras de sangue são de cargas virais potencialmente baixas, perto do limite de detecção. Um estudo chinês, ao analisar mais de 7.400 doadores de sangue, detectou quatro indivíduos infectados com SARS-CoV-2, apresentando carga viral plasmática extremamente baixa: dois permaneceram assintomáticos e dois relataram sintomas de febre após a doação (CHANG, et al., 2020).

O diagnóstico laboratorial padrão em amostras respiratórias para confirmar a infecção por SARS-CoV-2 são os testes moleculares de RT-PCR. Esta metodologia tem como alvo o genoma do patógeno, tornando-o um método específico e confiável (ZHOU, et al., 2020). Em ambos os protocolos de RT-PCR utilizados neste estudo, o limite de detecção é o valor de Ct <40 nos genes alvo. O kit utilizado foi *GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp kit* (teste *multiplex*), que apresenta uma sensibilidade analítica de concentração 0,5 cópias do genoma/microlitro (cópias/ $\mu$ L) de SARS-CoV-2, que pode ser detectada em amostras respiratórias do trato superior e escarro. O protocolo *CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic* (teste *singleplex*) apresenta uma sensibilidade analítica de concentração de  $10^0 \cdot 5$  RNA/ $\mu$ L. As diferenças nos valores de Ct ao comparar os resultados obtidos nos dois protocolos mostraram que houve uma variação de -8,09 a -5,26 ciclos para a análise individual do gene-alvo do nucleocapsídeo. O método *singleplex* apresentou um valor de Ct menor, enquanto o método *multiplex* apresentou maior número de detecção. Esta discrepância do valor Ct também foi observado entre as mesmas amostras analisadas, mostrando que houve uma variação de -8,09 a +8,42 ciclos, sem distinção de gene alvo. Nesta análise, observamos que o método *multiplex* apresentou um número maior de detecções no gene do RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) quando comparado ao gene do nucleotídeo.

O ensaio *singleplex* apresenta uma maior sensibilidade devido à ausência de competitividade entre as sondas fluorescentes durante a amplificação do material genético. Já nos ensaios em formato *multiplex*, esta competição entre as sondas de diferentes alvos durante a reação é maior. Esse interferente ocorre devido à presença de um alvo expresso em níveis mais altos, resultando em baixo desempenho dos alvos expresso em níveis mais baixos (HENEGARIU et al., 1997).

Para a detecção de RNA de SARS-CoV-2, analisamos amostras de plasma de doadores de sangue coletadas em diferentes períodos da pandemia de COVID-19 no Brasil. Dentre as amostras que apresentaram positividade, observamos que o período de coleta era referente ao mês de janeiro de 2022. Neste período ocorria a terceira onda de COVID-19 no Brasil. Esta onda de transmissão foi considerada a mais curta (de 26 de dezembro de 2021 a 21 de maio de 2022), quando comparada à 1ª e 2ª ondas de casos no país (MOURA et al., 2022). O principal motivo pelo qual a pandemia por SARS-CoV-2 teve longa duração foi a alta capacidade de transmissão e adaptação deste vírus, devido às mutações na proteína S. Embora os efeitos decorrentes destas substituições de aminoácidos na entrada viral e nos mecanismos de evasão da resposta imune ainda estejam em estudo, sabe-se que algumas destas mutações podem afetar a dinâmica de replicação viral na célula hospedeira e, conseqüentemente, formar trocas de várias linhagens dominantes em curto período - menos de 2 anos de pandemia, como foi observado (TELENTI et al., 2021; KISSLER et al., 2021; WASHINGTON et al.; 2021; LEE et al., 2022).

Em geral, os vírus que desencadeiam infecções respiratórias são replicados e disseminados pelo trato respiratório superior. Quando associados à invasão e replicação no trato respiratório inferior, tornam-se uma doença com quadro clínico grave. Quando ocorrem as mutações genéticas que otimizam o uso da ACE2 como receptor do vírus, como o SARS-CoV-2, favorecendo o aumento da replicação viral nos tratos respiratórios superiores e inferiores, o resultado pode ser tanto o aumento da transmissibilidade quanto o aumento da virulência, sendo este último responsável por tornar a doença clinicamente mais grave (TELENTI et al., 2021; HOFFMAN et al., 2020; LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020).

Com as mutações genéticas, o genoma do vírus SARS-CoV-2 passa por mudanças constantemente, e com isso surgem as novas variantes. Conforme o vírus se espalha, estas variantes podem surgir e desaparecer, ou podem persistir. As variantes do vírus SARS-CoV-2 são definidas, segundo a Organização Mundial da

Saúde (OMS), como variantes de interesse (VOI) e variantes de preocupação (VOC) conforme o seu potencial de transmissão e de virulência (World Health Organization, 2020). Durante pandemia da COVID-19, as VOCs despertaram grande preocupação por possuírem alto potencial de transmissão ou modificações prejudiciais no contexto epidemiológico da COVID-19; alto potencial de virulência ou mudanças na manifestação clínica da doença; e/ou redução da efetividade das medidas sociais e de saúde pública ou dos diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis (ZHANG et al., 2022). A VOC predominante durante a terceira onda de pandemia no Brasil, no mês de janeiro de 2022, foi a Ômicron. Esta variante foi a principal responsável pela alta taxa de morbidade por COVID-19 no Brasil, enquanto a Gama destaca-se pela alta taxa de mortalidade (MOURA et al., 2022).

A triagem em doadores de sangue para a detecção do RNA de SARS-CoV-2 em sangue periférico foi ampliada para análise de *buffy coat* (camada de células leucocitárias) obtidas do sangue periférico, diante de estudos como o de Moustafa, Khalel e Aziz (2021), onde o RNA viral foi detectado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*). Assim como o estudo de Feng e colaboradores (2020), que observou a presença de antígeno de SARS-CoV-2 em monócitos ao analisar o baço e nos gânglios linfáticos post mortem, com sinais patológicos de dano. Contudo, não foi esclarecido se houve replicação viral ativa ou fagocitose, nem se os monócitos foram infectados antes de atingir os tecidos linfóides secundários. Em nosso estudo, o teste molecular do *buffy coat* não apresentou evidências de RNA-SARS-CoV-2 em PBMC.

### 5.3 CASO DE POSITIVIDADE EM DOADOR ASSINTOMÁTICO

A presença de RNA viral detectado na avaliação molecular por RT-PCR nem sempre indica a presença do vírus infeccioso na amostra clínica. Isso é especialmente relevante quando os resultados da RT-PCR apresentam sinais fracos, sugerindo baixos níveis de RNA. Portanto, é fundamental interpretar os resultados com cautela, uma vez que as reações de RT-PCR não confirmam diretamente a presença do vírus infeccioso. Além disso, a possibilidade de resultados falso-positivos ou contaminação do ensaio não pode ser descartada (LONG et al., 2020; HAGMAN et al., 2021).

Embora a transmissão predominante do SARS-CoV-2 seja através do contato com secreções respiratórias de indivíduos infectados, é importante considerar que

esse vírus pode também invadir órgãos além dos pulmões, levando à detecção de RNA viral no soro ou plasma de pacientes assintomáticos (LI et al., 2021). Embora não haja evidências de transmissão transfusional do SARS-CoV-2, há relatos de transfusões de componentes sanguíneos de doadores diagnosticados com COVID-19. Por exemplo, Cho e colaboradores (2020) descreveram um paciente com anemia aplástica grave e em uso de imunossupressores que recebeu plaquetas de um doador assintomático com COVID-19. No entanto, nesse caso, não foi observada replicação viral que resultasse em infecção no paciente que recebeu a transfusão.

Em resumo, os testes diagnósticos, incluindo a detecção do material genético viral por meio de testes NAT e a identificação de anticorpos, são ferramentas úteis para detectar a presença do SARS-CoV-2 em componentes sanguíneos. A avaliação de infecções assintomáticas por SARS-CoV-2 geralmente se concentra em indivíduos com alto risco de infecção, muitos dos quais são identificados devido ao contato com pessoas sintomáticas. Isso pode levar a uma subestimação da verdadeira extensão das infecções assintomáticas. Portanto, para uma avaliação mais precisa, a triagem em larga escala da população é a abordagem mais adequada, considerando que a proporção de infecções assintomáticas pode ser ainda maior nesse contexto (GUDBJARTSSON et al., 2020; LONG et al., 2020).

#### 5.4 POTENCIAL DE REPLICAÇÃO VIRAL DE SARS-COV-2 NO PLASMA

A detecção de SARS-CoV-2 no sangue levanta questionamentos sobre a sua patogênese, assim como preocupações com a segurança da transfusão sanguínea. No contexto da avaliação do risco de transmissão do SARS-CoV-2, nosso estudo se propôs a avaliar a capacidade de replicação ativa do vírus obtido do sangue periférico, buscando responder à seguinte indagação: Uma vez que a RNAemia é detectada, é possível isolar o vírus ativo? O isolamento e a subsequente replicação viral *in vitro* são cruciais para monitorar e compreender a sua habilidade de causar infecção no organismo humano.

Foi empregada a metodologia similar ao estudo de Cappy e colaboradores (2020), que investigou a presença de RNA SARS-CoV-2 no plasma sanguíneo de doadores de sangue que apresentaram sintomas característicos da COVID-19 após a doação de sangue. Em nosso estudo, a capacidade de replicação a partir de plasmas positivos para o RNA de SARS-CoV-2 não foi confirmada. É relevante ressaltar que

as amostras de plasma utilizadas em nosso estudo foram provenientes de pacientes com COVID-19 que exibiram sintomas graves. Embora o RNA de SARS-CoV-2 seja detectado no sangue, até o presente estudo, o SARS-CoV-2 infeccioso não foi isolado com sucesso do sangue periférico de pacientes com COVID-19.

Diversos estudos sugerem que a presença do SARS-CoV-2 na corrente sanguínea é transitória e com o propósito de disseminação para células-alvo secundárias (XIONG et al., 2020; VERAS et al., 2020; PONTELLI et al., 2022). Assim como nosso estudo, Andersson e colaboradores (2020) também não obtiveram sucesso em cultivar SARS-CoV-2 a partir de soros positivos para o RNA viral, utilizando células Vero E6.

A presença de RNA do SARS-CoV-2 detectável no sangue não necessariamente indica a presença de RNA viral livre, uma vez que o RNA viral no plasma clínico é suscetível à degradação. A ação das ribonucleases no sangue do hospedeiro pode levar à hidrólise do RNA viral livre, contribuindo para sua deterioração. Portanto, a ausência de detecção não implica necessariamente na ausência de infecção na amostra analisada (NELSON et al., 2004; POMAR, NIELSEN-SAINES, BAUD, 2021).

Ademais, a falta de replicação do SARS-CoV-2 em amostras de plasma positivas sugere que a escolha de métodos adequados para o cultivo viral é um fator crucial. Considerando que alguns virions apresentam afinidade pelas plaquetas no sangue, o uso de plasma rico em plaquetas poderia ser uma alternativa mais eficaz para o cultivo do vírus. Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar essa hipótese, visto que ainda não há conclusão definitiva quanto à integridade e infecciosidade do RNA viral detectado (Jacobs et al., 2022).

Em conclusão, no presente estudo, o isolamento viral não foi possível em amostras de plasma com baixa carga viral estimada.

## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL EM AMOSTRAS DE PLASMA POSITIVO PARA SARS-COV-2

A relação entre a carga viral e a patogenicidade de um patógeno, bem como sua influência na gravidade dos sintomas clínicos, é um aspecto fundamental a ser considerado. Por isso, a quantificação absoluta da carga viral por RT-PCR é de extrema importância na detecção do RNA de SARS-CoV-2 em amostras de plasma

de doadores de sangue. Esse parâmetro nos permite entender a dinâmica viral nos doadores que testaram positivo para o vírus.

Os ensaios quantitativos de RT-PCR com auxílio de um padrão de referência, fornece um valor de Ct, o qual é inversamente correlacionado à concentração do RNA viral alvo na amostra clínica. No entanto, ao estabelecer um valor de Ct ou número de cópias de RNA como limite de detecção, não se pode inferir que a carga viral de RNA detectada indique necessariamente o início ou o término da infecção (PUHACH; MEYER; ECKERLE, 2023).

Ao comparar a carga viral entre os plasmas avaliados, observamos que o ensaio em formato *singleplex* apresentou maior número de amostras quantificadas e a menor carga viral em relação ao ensaio *multiplex*.

Uma das grandes limitações a serem consideradas são os valores de Ct. A sensibilidade analítica e os limites de detecção em uma reação de RT-PCR quantitativo podem variar entre os testes e laboratórios. Sendo assim, ao aplicar o uso de padrões de RNA e o cálculo do número de cópias do genoma de RNA com base em uma curva padrão, obtém-se maior reprodutibilidade entre laboratórios e testes (VAN KASTEREN et al., 2020). Outra limitação importante são as diferenças de *primers* e sondas que apresentam diferentes eficiências de PCR e propriedades de ligação, resultando em diferenças nos valores de Ct. Por último, e provavelmente o ponto mais importante, é o tipo de amostra analisada. O SARS-CoV-2 é um vírus que causa infecções predominantemente respiratórias, mas que apresenta uma fase sanguínea para infectar múltiplos órgãos extrapulmonares (LEE, 2021; LI et al., 2021). A fase sanguínea de RNAemia foi considerada breve em alguns estudos, com duração de 11 a 21 dias, diminuindo ao longo de 10 dias e carga viral apresentando baixos níveis (ZHENG et al., 2020; JACOBS et al. 2022).

No presente estudo, a carga viral média detectada foi de  $9,3 \times 10^4$  cópias/ $\mu\text{L}$  (intervalo de  $5,18 \times 10^3$  a  $4,19 \times 10^5$ ), com Ct mínimo de 28,73. Esta viremia representava cinco doadores de sangue e um paciente com quadro clínico grave. Em estudos semelhantes, a carga viral foi semelhante no início da infecção em pacientes assintomáticos e sintomáticos infectados com SARS-CoV-2; no entanto, a maioria dos estudos demonstrou eliminação viral mais rápida em indivíduos assintomáticos (CEVIK et al., 2021). Roedl e colaboradores (2021) relataram a presença de viremia em 76,19% dos pacientes sintomáticos analisados, com média de  $2,21 \times 10^3$  cópias/mL (intervalo de 0 a  $1,30 \times 10^5$ ). Este estudo analisou pacientes com histórico de

transplante de células tronco hematopoiéticas ou terapia com receptor de antígeno quimérico em células T. Já Olea e colaboradores (2021), com o objetivo de caracterizar a cinética da carga de RNA do SARS-CoV-2 no trato respiratório e no plasma (RNAemia viral), analisou 340 amostras de plasma e observou uma carga viral de  $6,5 \log^{10}$  cópias/mL (intervalo de 3,03 a  $10,6 \log^{10}$  cópias/mL).

A utilização da corrente sanguínea para invadir outros órgãos fora do sistema respiratório não é exclusiva do SARS-CoV-2, sendo mais comumente detectada em populações gravemente doentes. Isso porque a enzima conversora de angiotensina 2 é o receptor primário para SARS-CoV-2 e pode ser encontrada além das células do sistema respiratório, como as células endoteliais arteriais e venosas e em outras células perivasculares. Há também diversos estudos que descrevem a viremia em outros vírus respiratórios como o SARS-CoV-1, vírus influenza, vírus sincicial respiratório e adenovírus (GRANT; GARSON; TEDDER, 2003; CHOI et al., 2012; WAGHMARE et al., 2013; TANIGUCHI et al., 2012; HAMMING et al., 2004; CHEN et al., 2020).

Os conhecimentos atuais apontam que o SARS-CoV-2 utiliza a via sanguínea para atingir tecidos extrapulmonares, mas não se replica nas células sanguíneas periféricas. Nesta fase virêmica, ainda permanece incerto se o RNA viral detectado no sangue trata-se de um vírus intacto, de componentes virais como proteínas e ácidos nucleicos, ou de fragmentos de células infectadas. O estudo de Jacobs e colaboradores (2022) detalhou importantes pontos relacionados à RNAemia em amostras de plasma. O primeiro ponto é que o RNA viral detectado pode ser referente a partículas virais de vírus intactos. O segundo ponto importante de seu estudo é a quantificação absoluta de RNA viral a partir do uso de um padrão de RNA SARS-CoV-2 como melhor abordagem para estimar a carga viral do que pela determinação pelo valor Ct obtido de uma reação de RT-PCR. Outro ponto relatado foi que a quantidade de RNA viral detectado no pellet da amostra (após centrifugação) foi maior do que o RNA viral detectado no sobrenadante da amostra de plasma. Esta observação sugere que não se trata de um RNA circulante livre, mas sim associado a uma partícula viral ou a células infectadas, uma vez que o RNA circulante livre pode ser rapidamente degradado durante o processo de centrifugação. Contudo, não foi possível concluir se o RNA viral detectado era de vírus infeccioso.

Embora observemos uma baixa prevalência de doadores de sangue com carga viral detectada, não houve relato de sintomas gripais pós-doação em nenhum destes

indivíduos, sugerindo que permaneceram assintomáticos. É importante destacar que a detecção de RNA no sangue não é equivalente à infecciosidade, pois não podemos confirmar a capacidade do SARS-CoV-2 identificado na amostra de desenvolver uma infecção a partir do produto sanguíneo transfundido. Devido à carga viral muito baixa e ao limitado volume disponível de RNA identificado, não tentamos sequenciar nossas amostras para analisar a possível cepa do vírus.

Uma característica importante em relação ao RNA viral detectado é a estabilidade que esse material genético pode apresentar. Diversos estudos detectaram o RNA viral de SARS-CoV-2 em suas análises no sangue, mas não foi relatado a estabilidade deste vírus em amostras sanguíneas: um estudo de Chang, Yan e Wang (2020), que analisou mais de 7.000 amostras de sangue de doadores de sangue, detectou a presença de RNA viral em apenas quatro amostras. Cappy e colaboradores (2020) que relataram RNA SARS-CoV-2 positivo em três doadores de sangue. Yao com seus colaboradores (2021) observaram a fase virêmica SARS-CoV-2 em pacientes doentes e detectaram o material genético viral em células imunológicas como monócitos, macrófagos e endotélio vascular. Shen e colaboradores (2021) sugeriram a infecção de SARS-CoV-2 em plaquetas e megacariócitos independente da interação com o receptor ACE2, embora não foi totalmente esclarecida essa possibilidade.

O período e a forma de armazenamento (temperatura de congelamento) da amostra de plasma é um requisito importante que pode interferir indiretamente nos valores de Ct na reação de amplificação. Contudo, há estudos que sugerem que a carga viral de SARS-CoV-2 na análise de viremia em hemocomponentes não mantém-se intacto durante o processamento e armazenamento do sangue (Centers for Disease Control and Prevention, 2021; PUNCHOO; BHOORA,; BANGALEE, 2022; KIELY et al., 2022).

Para todas as análises do nosso estudo, utilizamos amostras arquivadas em um período de até um ano após coleta entre as análises. E sugerimos que as amostras que não mantiveram suas reprodutibilidades nas análises de detecção de RNA de SARS-CoV-2, pode ter perdido a estabilidade do material genético. O nosso estudo não tinha como objetivo avaliar a estabilidade do RNA.

Diante do desconhecimento sobre a disseminação do vírus SARS-CoV-2 nos bancos de sangue, os serviços de saúde atenderam as normas e diretrizes estabelecidas para prevenir o contágio pelo novo coronavírus. Estas medidas

adotadas pelos bancos de sangue durante a pandemia, sem o afastamento do candidato, incluíram uma série de intervenções para garantir o aumento da esterilização em todo o processamento do sangue para reduzir a transmissão do vírus (CAI; et al., 2020). Além dos processos de triagem do candidato a doação, a implementação da seleção e o questionamento de doadores são aplicados para identificar e eliminar doadores com fatores de risco conhecidos. Outras medidas adotadas pelos centros de coleta de sangue são os procedimentos para obter informações após a doação (PDI) e para recuperar produtos sanguíneos não utilizados de doadores que manifestem sintomas clínicos, recebam diagnóstico de infecção ou relembrem informações de risco pouco tempo após a doação (KWON et al.; 2020).

No atual cenário, após diversos estudos publicados sobre a hemovigilância sobre a COVID-19, a relação entre a carga viral de SARS-CoV-2 detectada em plasma e a progressão da doença (inflamação sistêmica e aumento do risco de morte) especialmente em indivíduos assintomáticos apresenta risco mínimo de transmissão transfusional (LEBALNC et al., 2020; KATZ, 2020; OWUSU et al., 2021; BAKKOUR et al., 2021; JACOBS et al., 2022; LECAM et al., 2022).

## 6 CONCLUSÃO

Nossos achados indicam uma baixa prevalência de RNAemia de SARS-CoV-2 no plasma de doação de sangue e, quando detectado, o RNA viral está em baixa concentração nestas amostras. Mesmo em doadores de sangue que não apresentam alta carga virêmica de SARS-CoV-2, conhecer a carga viral, e não somente um resultado detectado/não detectado em um teste qualitativo, pode fornecer orientação sobre a transmissão transfusional. Embora sejam necessários estudos adicionais sobre a transmissibilidade, vários estudos não mostraram infecciosidade por baixa carga viral SARS-CoV-2 em doadores de sangue.

## 7 REFERÊNCIAS

ABE, KT; et al. A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. **JCI Insight**. v. 5, n. 19, p. e142362, Oct. 2020

AMANAT, F.; et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature Medicine**. v. 26, n.7, p.1033-1036, Jul. 2020

AMIRTHALINGAM, G.; et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 among Blood Donors and Changes after Introduction of Public Health and Social Measures, London, UK. **Emerging Infectious Diseases**. v. 27, n. 7, p.1795-1801, Jul. 2021

ANDERSSON, M. I.; et al. SARS-CoV-2 RNA detected in blood products from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. **Wellcome Open Research**. v. 5, p. 181, 2020

ARAUJO, D. B.; et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, Oct. 2020

ATEF, D. M.; ATEF, R. M. Usefulness of nucleic acid testing among negative HBsAg blood donors in Egypt. **Transfusion and Apheresis Science**. v. 58,n. 4, p. 468–471, Aug. 2019.

BACKER, J. A.; KLINKENBERG, D.; WALLINGA, J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020. **Euro Surveillance**. v. 25, n. 5, p. 2000062, Feb. 2020

BAKKOUR, S.; et al. Minipool testing for SARS-CoV-2 RNA in United States blood donors. **Transfusion**. v. 61, n. 8, p. 2384-2391, Aug. 2021

BARBAN, G. B. Importância do teste do ácido nucléico–NAT–nos bancos de sangue do Brasil. **Ribeirão Preto, SP**, 2010.

BENTLEY, E.; et al. Collaborative study to establish a WHO international standard for SARS-CoV-2 RNA (**World Health Organization**, 2020). Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/ecbs/bs-2020-2402-sars-cov-2-rna-17-nov-2020.pdf?sfvrsn=1f6e6d86\\_2&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/ecbs/bs-2020-2402-sars-cov-2-rna-17-nov-2020.pdf?sfvrsn=1f6e6d86_2&download=true) .Acessado em: 30/04/2023.

BRASIL. [RECOMENDAÇÃO Nº 036, DE 11 DE MAIO DE 2020]. CNS- **CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE**. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/recomendacoes-cns/1163-recomendac-a-o-n-036-de-11-de-maio-de-2020>. Acessado em: 31 de maio de 2023

BRASIL. **Ministério da Saúde**. COVI-19 no Brasil. 2023. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19\\_html/covid-19\\_html.html](https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html) Acesso em 22 de agosto de 2023.

BOHN, M.K.; et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**. v. 58, n. 7, p. 1037-1052, Jun. 2020

BURKI, T. Outbreak of Coronavirus Disease 2019. **The Lancet Infectious Disease**. v. 20, n. 3, p. 292-293. Mar. 2020

BUSCH, M. P. Infectious risks of blood transfusions: Recent advances in testing technologies and new approaches to surveillance and decision-making. **ISBT Science Series**. v. 9, n. 1, p. 276–28, Jul. 2014

BUSCH, M. P.; STONE, M. Serosurveillance for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Incidence Using Global Blood Donor Populations. **Clinical Infectious Diseases**. v. 72, n. 2, p. 254-256, Jan. 2021

CAI, X.; et al. Blood transfusion during the Covid-19 outbreak. **Blood Transfusion**. v. 18, n. 2, p. 79-82, Mar. 2020

CASTRO, R. Vacinas contra a Covid-19: o fim da pandemia?. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**. v. 31, n.1, p. e310100, Apr. 2021

CAPPY, P.; et al. No evidence of SARS-CoV-2 transfusion transmission despite RNA detection in blood donors showing symptoms after donation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**. v. 136, n. 16, p. 1888–1891, Oct. 2020.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 31, n. 48, p. 652-654. Dec. 1982

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of HIV for transfusion- Missouri and Colorado, 2008. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 59, p. 1335–1339, 2010

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Frequently Asked Questions about Coronavirus (COVID-19) for Laboratories: Interpreting Results of Diagnostic Tests 2021 . Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/faqs.html>. Acesso em 17 de agosto de 2023

CEVIK, M.; et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Microbe**. v. 2, n. 1, p. e13-e22, Jan. 2021

CHANG, L.; YAN, Y.; WANG, L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 34, n. 2, p. 75-80, Apr. 2020

CHANG, L.; et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Detected in Blood Donations. **Emerging infectious diseases** v. 26, n. 7, p. 1631-1633, Jul. 2020

CHANG, L.; YAN, Y.; WANG, L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 34, n. 2, p. 75-80, Apr. 2020

CHAO, Y. X.; RÖTZSCHKE, O.; TAN, E. K. The role of IgA in COVID-19. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 87, p. 182-183, Jul. 2020

CHEN, L.; et al. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. **Cardiovascular research**. v. 116, n. 6, p. 1097–1100, May, 2020

CHEN, Y.; et al. [Epidemiological characteristics of infection in COVID-19 close contacts in Ningbo city]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. v. 41, n. 5, p. 667-671, **Chinese**, May. 2020

CHEN, W.; et al. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. **Emerging microbes & infections**. v. 9, n. 1, p. 469-473, Feb. 2020

CHO, H. J.; et al. COVID-19 transmission and blood transfusion: A case report. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1678-1679, Nov. 2020

CHOI, S. M.; et al. Influenza Viral RNA Detection in Blood as a Marker to Predict Disease Severity in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 206, n. 12, p. 1872–1877, Dec. 2012

DEEKS, J. J.; et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 6, n. 6, Jun., 2020

FAJNZYLBBER, J.; REGAN, J.; COXEN, K.; et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. **Nature Communications**. v. 11, n. 1, p. 5493, Oct. 2020

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**. v. 374, n. 7, p. 601-604, Feb. 2016

FENG, Z.; et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. **MedRxiv** .2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>

FISCHER, B.; KNABBE, C.; VOLLMER, T. SARS-CoV-2 IgG seroprevalence in blood donors located in three different federal states, Germany, March to June 2020. **Euro Surveillance**. v. 25, n. 28, p. 2001285, Jul. 2020

GALANTI, M.; et al. Rates of asymptomatic respiratory virus infection across age groups. **Epidemiology and Infection**. v. 147, n. 1, p. 176, Jan. 2019

GRANT, P. R.; GARSON, J. A.; TEDDER, R. S. Detection of SARS Coronavirus in Plasma by Real-Time RT-PCR. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 25, p. 2468-2469, Dec. 2003

GLOWACKA, I.; et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. **Journal of Virology**. v. 85, n. 9, p.4122-4134, Mai. 2020

GOODNOUGH, L. T. Blood management: transfusion medicine comes of age. **The Lancet**, v. 381, n. 9880, p. 1791-1792, May. 2013.

GUDBJARTSSON, D. F.; et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population. **The New England Journal Medicine**. v. 382, n. 24, p. 2302-2315, .Jun. 2020

HAGMAN, K.; et al. SARS-CoV-2 RNA in serum as predictor of severe outcome in COVID-19: a retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 73, n. 9, p. 2995–3001, Nov. 2021

HAMMING, I.; et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**. v. 203, n. 2, p. 631-637, May. 2004.

HENEGARIU, O.; et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**. v. 233, n. 3, p. 504–511, Sept.1997

HOFFMANN, M.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**. v. 181, n. 2, p.271-280, Apr. 2020

JACOBS, J. L.; et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viremia Is Associated With Coronavirus Disease 2019 Severity and Predicts Clinical Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**. v. 74, n. 9, p. 1525-1533, May. 2022

KASPERSEN, K. A.; et al. Estimation of SARS-CoV-2 Infection Fatality Rate by Age and Comorbidity Status Using Antibody Screening of Blood Donors During the COVID-19 Epidemic in Denmark. **The Journal of Infectious Diseases**. v.225, n. 2, p. 219-228, Jan. 2022

KATZ, L. M. Is SARS-CoV-2 transfusion transmitted?. **Transfusion**. v. 60, n. 6, p. 1111-1114, Jun. 2020

KIELY, P.; et al. Emerging infectious diseases and blood safety: modeling the transfusion-transmission risk. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 31, n. 3, p. 154–64, Jul. 2017

KIELY, P.; et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Blood Safety: An Updated Review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. v. 49, n. 4, p. 218–229, Aug. 2022

KISSELER, S. M.; et al. Densely Sampled Viral Trajectories Suggest Longer Duration of Acute Infection with B.1.1.7 Variant Relative to Non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. **MedRxiv**. 2021 disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.21251535>

KWON, S. Y.; et al. Post-donation COVID-19 identification in blood donors. **Vox Sanguinis**. v. 115, n. 8, p. 601-602, Nov. 2020

KOSAN, E.; et al. Can the nucleic acid amplification test (NAT) be an alternative to the serologic tests? A prospective study, the results of 18,200 blood donors from the Turkish Red Crescent. **Transfusion and Apheresis Science**. v. 43, n. 3, p. 269–272, Dec. 2010

LAI, C. C.; et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. **Journal of Microbiology, Immunology Infection**. v. 53, n. 3, p. 404-412, Jun. 2020

LECAM, S.; et al. Low rate of RNAemia in blood donations collected during the first wave of COVID-19 in France. **Transfusion**. v. 62, n. 3, p. 633-640, Mar. 2022

LEE, J. Y.; et al. Absolute quantitation of individual SARS-CoV-2 RNA molecules provides a new paradigm for infection dynamics and variant differences. **eLife**. v. 11, p. e74153, Jan. 2022

LEE, M. J. Quantifying SARS-CoV-2 viral load: current status and future prospects. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v. 2, n. 10, p. 1017-1023, Oct. 2021

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**. v. 5, n. 4, p. 562-569, Apr. 2020

LI, Y.; et al. SARS-CoV-2 viremia is associated with distinct proteomic pathways and predicts COVID-19 outcomes. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 131, n. 13, p. e148635, Jul. 2021

LONG, Q. X.; et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nature Medicine**, v. 26, n. 8, p. 1200-1204, Jun. 2020.

LU, R; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**. v. 395, n. 10224, p. 565–574, Feb. 2020

MARTINS, S. T.; NOBREGA, J. O. T. Segurança transfusional no Brasil: dos primórdios ao NAT. **RBAC**. v. 50, n. 4, p. 315-320, Nov. 2018

Ministério da Saúde (BR). Boletim Epidemiológico Especial. Doença pelo Coronavírus COVID-19. Brasília: Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**; 2020 [citado 29 dezembro 2020] Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/30/boletim\\_epidemiologico\\_covid\\_43\\_final\\_co e.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/30/boletim_epidemiologico_covid_43_final_co e.pdf)

MOURA, E. C.; et al. Covid-19: evolução temporal e imunização nas três ondas epidemiológicas, Brasil, 2020–2022. **Revista de Saúde Pública**. v.56, p. 105. 2022

MOUSTAFA, A.; KHALEL, R. S.; AZIZ, R. K. Traces of SARS-CoV-2 RNA in peripheral blood cells of patients with COVID-19. **OMICS**. v. 25, n. 8, p. 475–483, Aug. 2021

National Institutes of Health. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed 23 March 2023.

NELSON, P. T.; et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. **Nature Methods**. v. 1, n. 2, p. 155-61. Nov. 2004

NG, D. L.; et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood. **Nature Communicate**. v. 11, n.1, p.4698, Sept. 2020

NISHIURA, H.; et al. The Rate of Underascertainment of Journal Pre-proof 6 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Infection: Estimation Using Japanese Passengers Data on Evacuation Flights. **Journal of Clinical Medicine**. v. 9, n. 2, p. 419, Feb. 2020

OLEA, B.; et al. Lower respiratory tract and plasma SARS-CoV-2 RNA load in critically ill adult COVID-19 patients: relationship with biomarkers of disease severity. **The Journal of Infection**. v. 83, n. 3, p. 381–412. Sep. 2021

OLIVEIRA, W. K.; et al. Como o Brasil pode deter a COVID-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 29, n. 2, 2020

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **A atual situação da COVID-19**. Brasil:OMS, 2021.

OWUSU, M.; et al. Low risk of SARS-CoV-2 in blood transfusion. **PLoS One**. v. 16, n. 4, p. e0249069, Apr. 2021

PERKINS, H. A.; BUSCH, M. P. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. **Transfusion**. v. 50, n. 10, p. 2008–2099, Oct. 2010.

PHAN, T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 79, p. 104211, Apr. 2020

PIZZICHINI, M. M. M.; PATINO, C. M.; FERREIRA, J. C. Medidas de frequência: calculando prevalência e incidência na era do COVID-19. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 46, n. 3, 2020

POMAR, L.; NIELSEN-SAINES, K.; BAUD, D. Stability of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA in placenta and fetal cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 224, n. 1, p. 126-127, Jan. 2021

PUNCHOO, R.; BHOORA, S.; BANGALEE, A. Laboratory considerations for reporting cycle threshold value in COVID-19. **EJIFCC**, v. 33, n. 2, p. 80, Aug. 2022

PONTELLI, M. C.; et al. SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients. **Journal of Molecular Cell Biology**. v.14, n. 4, Apr. 2022

PUHACH, O.; MEYER, B.; ECKERLE, I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. **Nature Reviews Microbiology**. v.21, n. 3, p. 147-161, Mar. 2023

ROEDI, K. et al. Viral Dynamics of SARS-CoV-2 in Critically Ill Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients and Immunocompetent Patients with COVID-19. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 203, n. 2,; p. 242-245, Jan. 2021

Secretaria Municipal da Saúde (BR). Boletim Epidemiológico. Ribeirão Preto: **Departamento de Vigilância em Saúde e Planejamento**; 2020 Disponível em: <https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/files/ssauade/boletim/20-10-2020.pdf>

SHARFSTEIN, J. M.; BECKER, S. J.; MELLO, M. M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. **JAMA**. v. 323, n. 15, p. 1437–1438, Apr. 2020

SHEN, C.; et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. **JAMA**. v. 323, n. 16, p. 1582-1589, Apr. 2020

SHEN, S.; et al. SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism. **Journal of hematology & oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-5, Apr. 2021

SLOT, E.; et al. Low SARS-CoV-2 seroprevalence in blood donors in the early COVID-19 epidemic in the Netherlands. **Nature Communication**. v. 11, n. 1, p. 5744, Nov. 2020

STRAMER, S. L.; et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. **Transfusion**. v. 49, n. 2, p. 1 - 29, Aug. 2009

STRAMER, S. L.; et al. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid–Amplification Testing. **The New England Journal of Medicine**. v 351, n.8, p. 760-768, Aug. 2004

STRINGARI, L. L.; et al. Covert cases of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: An obscure but present danger in regions endemic for Dengue and Chikungunya viruses. **Plos One**. v. 16, n. 1, p. e0244937, Jan. 2021

SULE, W. F.; OLUWAYELU, D. O. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. **Pan Africa Medical Journal**. v. 35, n. 2, p. 121, Jul. 2020

SUN, B.; et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. **Emerging Microbes Infection**. v. 9, n. 1, p. 940-948, May. 2020

TANIGUCHI, K.; et al. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. **Annals of Hematology**. v. 91, p. 1305–1312, Apr. 2012

TELENTI, A.; et al. After the pandemic: perspectives on the future trajectory of COVID-19. **Nature**. v. 596, n. 7873, p.495-504, Aug. 2021.

UDUGAMA, B.; et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS Nano**. v. 14, n. 4, p. 3822-3835, Mar. 2020

VABRET, N.; et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. **Immunity**. v. 52, n. 6, p. 910-941, Jun.2020

VALENTI, L.; et al. Trends and risk factors of SARS-CoV-2 infection in asymptomatic blood donors. **Transfusion**. v. 61, n. 12, p. 3381-3389, Dec. 2021

VALENTI, L.; et al. SARS-CoV-2 seroprevalence trends in healthy blood donors during the COVID-19 outbreak in Milan. **Blood Transfusion**. v. 19, n. 3, p. 181-189, May. 2021

VALONES, M. A. A.; et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiol.** v. 40, n. 1, p. 1-11, Jan.-Mar. 2009

VAN KASTEREN, P. B.; et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. **Journal of Clinical Virology**. v. 128, p. 104412, Jul. 2020

VERAS, F. P.; et al. SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, p. e20201129, Dec. 2020.

VEYER, D.; et al. Highly sensitive quantification of plasma SARS-CoV-2 RNA sheds light on its potential clinical value. **Clinical Infectious Diseases**. v. 73, n. 9, p. 2890–2897, Nov. 2020

VILANOVA, M. Vacinas e imunidade. **Revista de Ciência Elementar**. v. 8, n. 2, p. 021, Jun. 2020

XIONG, Y.; et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging Microbes and Infections**. v. 9, n. 1, p. 761-770, De. 2020

ZHANG, Y.; et al. SARS-CoV-2 variants and countermeasures. **Frontiers of Medicine**. v. 16, n. 2, p. 196–207, Apr. 2022

ZHAO, J.; et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**. v. 71, n. 16, p. 2027-2034, Nov. 2020

ZHENG, S.; et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. **BMJ**. v.369, p. 1443, Apr. 2020

ZHOU, P.; et al. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. **Nature**. v. 579, n. 7798, p. 270–273, Mar. 2020

ZHU, N.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**. v. 382, n.8, p. 727-733, Feb. 2020

ZUCHERATO, V. S.; et al. SARS-CoV-2 serological cross-reactivity testing in Brazilian blood donors, October-December, 2019. **Journal of Infection**. v. 84, n. 2, p. e1-e2, Feb. 2022

WAGHMARE, A.; et al. Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Disease in Hematopoietic Cell Transplant Recipients: Viral RNA Detection in Blood, Antiviral Treatment, and Clinical Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**. v. 57, n. 12, p. 1731–1741, Dec. 2013

WANG, Q.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**. v. 181, n. 4, p.894-904, May. 2020

WANG, W.; et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. **JAMA**. v. 323, n. 18, p. 1843–1844, 2020

WASHINGTON, N. L.; et al. Emergence and rapid transmission of SARS-CoV-2 B.1.1.7 in the United States. **Cell**. v.184, n. 10, p. 2587–2594, May. 2021

**World Health Organization**. Tracking SARS-CoV-2 variants. 2020. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (accessed 28/03/2023)

Anti-SARS-CoV-2 IgG (ELISA). Instruction for use. 2020 disponível em: <https://testecovid19.org/wp-content/uploads/2018/10/Anti-SARS-CoV-2-ELISA-IgG.pdf?x45112>

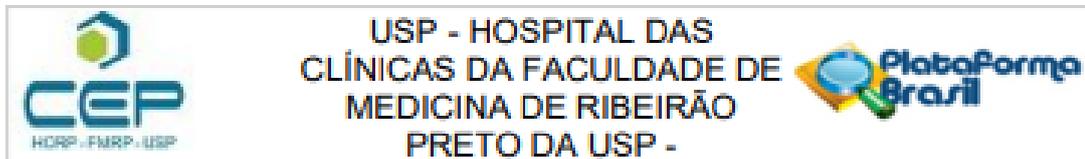
YAO, X. H.; et al. A cohort autopsy study defines COVID-19 systemic pathogenesis. **Cell Research**, v. 31, n. 8, p. 836-846, Jun. 2021.

**Bula** GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit - Instructions for Use. 24-June 2021 (rev.3) IFMR-45. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/137116/download>

**Bula** CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel.

Instructions for Use. CDC-006-00019, Revision: 08 Effective: 03/07/2023 Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>

**Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Este trabalho está vinculado ao projeto SARS-CoV-2 e o impacto na transmissão transfusional.**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** SARS-CoV-2 e o impacto na transmissão transfusional

**Pesquisador:** Simone Kashima Haddad

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 36614120.5.0000.5440

**Instituição Proponente:** Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

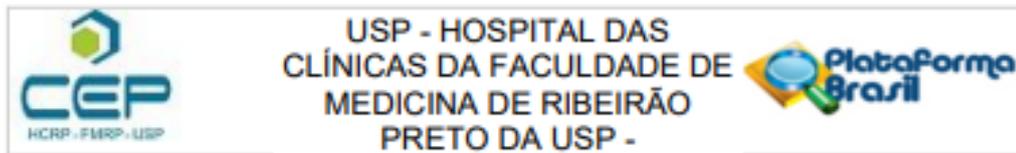
**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.299.983

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de pesquisa a ser realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto e no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - USP, tendo como investigadora principal, Simone Kashima Haddad. **Epidemiologia da SARS-CoV-2** A síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2), responsável por causar a doença COVID-19, surgiu no final de dezembro de 2019 em Wuhan (China) e se espalhou rapidamente causando um surto epidêmico mundial. Em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou a COVID-19 como Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional, devido aos sérios riscos econômicos e sociais tornando imprescindível uma resposta internacional coordenada e estruturada (LI, et al., 2020). A síndrome causada pelo SARS-CoV-2 é caracterizada pela infecção do trato respiratório inferior, pneumonia severa que pode levar à uma lesão pulmonar aguda fatal (LPA) e também a síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA). Definido pela alta transmissibilidade, o SARS-CoV-2 representa uma grande ameaça à saúde pública mundial, pois exibe alta morbidade e mortalidade populacional (YE et al., 2020). A infecção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 comumente exibe como manifestações clínicas como febre e tosse, seguida do desenvolvimento de patologias no trato respiratório inferior. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o surto proveniente de SARS-CoV, em 2002-2003, relatou 8.096 casos confirmados/774 mortes em 29

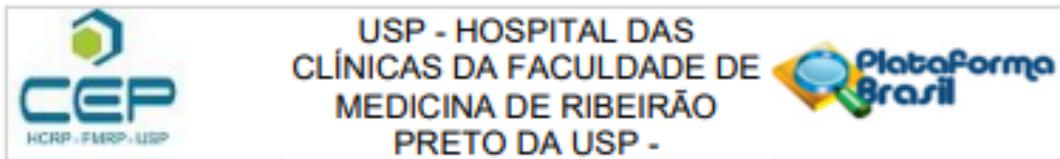
**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-000  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3632-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.299.983

países, possuindo uma taxa de letalidade equivalente a 9,6%; já o surto de MERS-CoV, iniciado em 2012, foi responsável por 2.494 casos confirmados/858 mortes em 37 países, possuindo uma taxa de letalidade igual à 34,4%. No entanto, no final de fevereiro de 2020, a China registrou 72.528 casos confirmados/1.870 mortes, traduzindo-se em uma taxa de letalidade bruta de 2,8%. A análise comparativa entre estes dados, demonstra que SARS-CoV-2 leva à mais mortes totais devido ao elevado número de casos confirmados. Contudo, é imprescindível levar em consideração que o número de casos mundiais devem ser maiores que os registrados, uma vez que há dificuldade na identificação de casos leves e assintomáticos, além da falta de testes para diagnósticos, o que leva à não contagem no denominador para a análise da taxa de letalidade. Com isso, para um estudo com maior precisão das taxas de letalidade de SARS-CoV-2, é necessário uma interpretação com mais cautela dos dados, juntamente com o desenvolvimento de mais pesquisas, levando em consideração os fatores importantes, como os casos subnotificados devido à falta de testes suficientes para diagnóstico, e também a presença de inúmeros casos leves e assintomáticos (WU, et al., 2020). O sequenciamento do genoma do agente causador dos casos de Wuhan identificou uma cepa viral com 88% de semelhança com as sequências de duas síndromes respiratórias agudas graves derivadas de morcegos (SARS), denominadas bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21, e com 50% de semelhança com a sequência de MERS-CoV. Consequentemente, o novo agente patogênico foi titulado como um novo coronavírus, pertencente ao grupo -CoV, e denominado oficialmente como SARS-CoV-2. Muitas lacunas para o entendimento da biologia da infecção pelo SARS-CoV-2 ainda estão em aberto como: a compreensão da evolução da doença e fisiopatogênese da COVID-19, tratamento e estudo de vacinas. A principal via de transmissão entre humanos ocorre por meio de gotículas respiratórias e aerossóis de uma pessoa infectada. Essas gotículas respiratórias e aerossóis podem chegar ao pulmão humano por inalação pelo nariz ou pela boca (HUANG et al., 2020). Estudos já demonstraram a presença do material genético do vírus em amostras de sangue, urina e fezes, deixando incertezas sobre o real mecanismo de transmissão. Um estudo relatou presença de RNA do vírus em plasma de 15% dos pacientes analisados (PENG et al., 2020). O tempo para que o vírus infecte o indivíduo e comece a desencadear sintomas é de aproximadamente 14 dias (CHANG et al., 2020). Entretanto, a ausência de sintomas clínicos é que torna preocupante a cadeia de transmissão, uma vez que inviabiliza o diagnóstico e o isolamento (LAI et al., 2020). O tempo entre a exposição do paciente ao vírus e o tempo para o início da infecção pode ser menor que o tempo de incubação observado em seu estudo o que reflete nas implicações para a transmissão (LAUER et al., 2020). SARS-CoV-2 e a hemoterapia. Para hemoterapia ainda não é claro

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.299.983

o impacto da transmissão transfusional do SARS-CoV-2. Os casos assintomáticos na infecção por SARS-CoV-2 implicam diretamente na elegibilidade do doador de sangue. Ainda não foi evidenciada a transmissão transfusional. Recentemente, um relato de transfusão com bolsa de plaquetaférese de um doador diagnosticado com COVID-19 não demonstrou transmissão do agente, uma vez que o receptor não apresentou sintomas relacionados à infecção e os testes de RT-PCR realizados subsequentemente foram negativos (CHO et al., 2020). Portanto, ainda é desconhecido o potencial de transmissão por transfusão. Para o cálculo do risco transfusional é importante estimar a incidência da infecção na população de doadores de sangue, entretanto, ainda se desconhece se há uma duração média da fase viremia na infecção pelo SARS-CoV-2. Um outro fator essencial é a dinâmica viral da infecção pelo SARS-CoV-2 que também não está esclarecida. A dinâmica da carga viral em amostras de escarro e de orofaringe de pacientes demonstra que o pico ocorre entre os dias 5 e 6 após o aparecimento dos sintomas (104 a 107 cópias/mL). No plasma, ainda não se conhece a carga e a persistência do SARS-CoV-2 e mesmo que já tenha sido demonstrada a baixa infectividade em portadores do SARS-CoV-2 assintomáticos (GAO et al., 2020), deve-se considerar o potencial de transmissão transfusional deste agente. No entanto, estudos mais detalhados sobre a carga viral e o período de viremia em indivíduos assintomáticos são essenciais. Além dos aspectos mencionados acima, a eficácia da transmissão de SARS-CoV-2 via transfusão de sangue também deve ser questionada, uma vez que trata-se de um vírus cujo tropismo se dá pelo tecido e células do trato respiratório humano (HUI et al., 2020). Até agora, a eficácia da transmissão do SARS-CoV-2 por transfusão de sangue é desconhecida. A recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003, ) existe um risco teórico de transmissão do vírus da SARS através da transfusão de produtos sanguíneos lábeis, uma vez que foi detectada baixa viremia até aproximadamente 10 dias após o início dos sintomas de pacientes prováveis da SARS. O risco de transmissão de transfusão sanguínea teórico para SARS foi confirmado (SHANG et al., 2007). Para MERS, ainda não há relato de caso transmitido por transfusão de sangue. Aburizaiza e colaboradores (2014) estudaram amostras de sangue por ensaio de imunofluorescência e não relataram achados positivos o que implica em baixo ou nenhum risco de transmissão de MERS por transfusão de sangue (ABURIZAIZA et al., 2014). Assim como SARS, a chance de detectar o vírus na amostra de sangue também é muito baixa. Portanto, pode-se concluir que há uma baixa chance de transmissão do vírus pelo sangue doado (AL-ABDALLAT et al., 2014). Por outro lado, não se pode garantir que o sangue não contaminado seja proveniente de casos não infectados. Um outro ponto é a inativação de patógenos que poderia contribuir para a segurança dos hemocomponentes uma vez que já foi demonstrada a redução

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



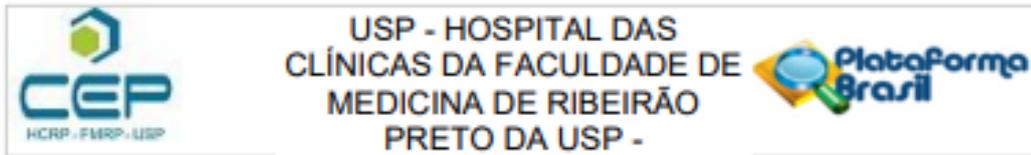
USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.299-583

da infectividade por SARS-CoV-2 no plasma inoculado e no sangue total (RAGAN et al., 2020). Portanto, a redução de patógenos em hemocomponentes pode ser uma estratégia eficaz para inativar o SARS-CoV-2 e garantir a segurança transfusional durante a pandemia de COVID-19. Entretanto, no Brasil, a maioria dos serviços de hemoterapia não usam este procedimento no processamento dos hemocomponentes. Embora a infectuosidade do sangue de pacientes com COVID-19 e sua transmissibilidade por transfusão não sejam comprovadas, a presença de RNA viral no sangue é preocupante, se considerarmos a rápida expansão do vírus na comunidade. Ademais, o longo período latente assintomático que limita a identificação do SARS-CoV-2 associado à capacidade dos hemocentros de realizar o diagnóstico. O diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 durante a triagem para doação de sangue seria um ponto importante para estudos de prevalência do RNA-SARS-CoV-2 no plasma de doadores, bem como avaliar o potencial de infectividade de amostras de plasma de doadores positivas. A proposta engloba a triagem molecular e sorológica de doadores de sangue uma vez que ainda não existe tal evidência que comprove a transmissibilidade transfusional dos coronavírus. Diagnóstico de SARS-CoV-2 O desenvolvimento de tecnologias tem sido imprescindível para o diagnóstico laboratorial da COVID-19, tanto sorológicos como moleculares. Vários métodos têm sido registrados no Brasil em caráter emergencial, mas a validação e seguimento clínicos dos casos torna-se primordial para a validação dos diversos métodos. Dentre eles, estão: i) os testes sorológicos, como os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e testes rápidos, do tipo point-of-care Testing (POCT) para detecção de IgM/IgG; ii) os testes de detecção de ácido nucleico (RT-qPCR), iii) sequenciamento e alto rendimento do RNA genômico, e iv) o cultivo viral (LI, et al., 2020). Uma abordagem a respeito de métodos rápidos devido à semelhança com SARS-CoV e MERS-CoV é a compreensão da resposta de anticorpos até 75% e 94,7% das infecções na primeira e segunda semana, respectivamente. Na terceira semana após o início dos sintomas, as taxas soropositivas para IgG atingiram 100%. Por outro lado, as taxas soropositivas para IgM permaneceram as mesmas, pois alguns pacientes começaram a declinar como resultado da troca de isotipo IgM para IgG, o que pode ajudar a gerar anticorpos mais eficazes que podem inibir a infecção pelo vírus (BAOQING et al., 2020). O diagnóstico padrão-ouro é o ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-PCR), a partir de amostras de swab combinado de naso e orofaringe, para a detecção de ácido nucleico viral. Rotineiramente, tem sido o método utilizado para confirmar o diagnóstico de SARS-CoV-2. Os ensaios são baseados em sua maioria nos protocolos oficiais preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que utilizam múltiplas regiões virais além de controle endógeno em reações separadas ou multiplex (WHO, 2020). A definição

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.299.983

dos parâmetros de sensibilidade (limite de detecção) e especificidade ainda são escassos nos testes moleculares, bem como a quantificação da carga viral em plasma de pacientes com COVID-19. Já foi demonstrado que o protocolo utilizado pelo laboratório, o tipo e número de amostras coletadas, o período de coleta podem levar a resultados discordantes. Resultados falso-negativos por RT-PCR já foram relatados após a realização de outros exames auxiliares, como tomografia computadorizada do tórax para detecção de lesões pulmonares em pacientes enfermos, e a repetição do ensaio de RT-PCR, retornaram positivos (LI, et al., 2020). Dessa forma, há a necessidade de padronização e validação dos protocolos para que haja incremento na sensibilidade da RT-PCR para SARS-CoV-2 na detecção das regiões gênicas virais.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Esta proposta tem por objetivo avaliar a presença de RNA-SARS-CoV-2 e anticorpos (IgG e IgM) no plasma de doadores de sangue e avaliar o risco transfusional, juntamente com a ampliação do centro de pesquisa para a realização de testes diagnósticos para SARS-CoV-2 (moleculares e sorológicos).

4. Avaliar a dinâmica de anticorpos em doadores de sangue. Nesta etapa, serão validados os testes sorológicos desenvolvidos com tecnologia nacional em parceria com o ICB-USP/SP;
5. Avaliar o risco transfusional da infecção por ZIKV.
6. Avaliar as características moleculares do ZIKV isolado de doadores de sangue: a origem, disseminação, genótipos e filogenia das cepas.
7. Avaliar a carga viral em plasma de SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19 e associar com o desfecho clínico da doença.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são relacionados às coletas de secreções respiratórias e sangue, por exemplo um desconforto passageiro devido a introdução do swab na região nasal/orofaringe ou a picada da agulha. Para minimizar os riscos as coletas serão realizadas por profissionais experientes da área de enfermagem com materiais descartáveis e estéreis.

Benefícios:

Os benefícios esperados da pesquisa são de auxiliar-nos a melhorar o diagnóstico clínico em indivíduos infectados pelo coronavírus. Para tanto, não existem benefícios diretos aos

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.299.983

participantes do estudo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa justifica-se porque uma importante lacuna está relacionada ao impacto da transmissão transfusional de SARS-CoV-2. Ainda se desconhece o período de viremia e mesmo assim, se a via transfusional seria passível de transmissão viral, além do desdobramento da infecção no receptor.

Serão coletadas amostras biológicas dos participantes do estudo provenientes do Hemocentro de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, divididos da seguinte maneira: 5. Avaliar o risco transfusional da infecção por ZIKV.6. Avaliar as características moleculares do ZIKV isolado de doadores d5. Avaliar o risco transfusional da infecção por ZIKV.6. Avaliar as características moleculares do ZIKV isolado de doadores de sangue: a origem, disseminação, genótipos e filogenia das cepas. A coleta das amostras ficará sob a responsabilidade de profissionais da área de enfermagem de cada instituição participante da pesquisa. Serão estabelecidos três grupos: a) amostras de sangue total de doadores de sangue (n=3.000); b) amostras biológicas de swab combinado (nasofaringe e orofaringe, n=2.000); c) amostras de plasma de pacientes com COVID-19 (n=200). Para a análise do RNA-SARS-CoV-2 no plasma, serão utilizados, o RNA extraído (eluato) dos minipools gerados na rotina de triagem do NAT para HIV, HCV e HBV que serão cedidos pelo Laboratório NAT do Hemocentro de Ribeirão Preto. Caso a sensibilidade do teste diagnósticos esteja comprometida, será processada a extração de RNA individual.

**Metodologia Proposta:**

1. Extração de RNA, SARS-CoV-2-RT-PCR multiplex. A extração do RNA será realizada a partir do QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) conforme especificação do fabricante. A detecção do RNA viral do SARS-CoV-2 será realizada por uma PCR em tempo real multiplex e PCR digital utilizando tecnologia TaqMan™ para amplificar as regiões genômicas N, E, S do SARS-CoV-2 e o controle RNaseP. 2. Sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio de SARS-CoV-2-RT-PCR multiplex. A sensibilidade analítica ou limite de detecção (LoD) será calculado pelo método de Probit (SPSS) a partir do número de cópias virais. A partir do padrão do Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológicos (NIBSC), será estabelecida uma curva padrão com diluições seriadas (10<sup>10</sup>-1 cópias/reação). Para determinar o LoD, 10 réplicas de cada diluição serão avaliadas em três

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.299.583

ensaios independentes. Os parâmetros de robustez e precisão, como repetibilidade e reprodutibilidade também serão avaliados. Para verificar a especificidade e sensibilidade diagnóstica, amostras previamente diagnosticadas como positivas e negativas para COVID-19 serão avaliadas. 3. Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2. A partir do estabelecimento da curva padrão descrita no item 4, será avaliada a carga viral de SARS-CoV-2 em diferentes amostras biológicas. 4. Sorologia para SARS-CoV-2. A soroprevalência de anti-SARS-CoV-2 IgG será avaliada utilizando o método desenvolvido pelo ICB-USP/SP e o kit ELISA Anti-SARS-CoV IgG (Euroimmun) seguindo as orientações do fabricante. 5. Sequenciamento de última geração e análise filogeográfica do SARS-CoV-2. O sequenciamento será realizado em sequenciador Illumina NextSeq 500 utilizando o kit NextSeq 500/550 HighOutput Kit v2.5 (300 Cycles) (Illumina). Os dados do sequenciamento passarão por uma pipeline pré-estabelecida para identificação viral composta pelos seguintes programas FastQC v.0.11.9, Trimmomatic v.0.39, Kraken2 v. v2.0.8, SPAdes v. 3.14.0 e Diamond v. 0.9.31. As variantes de SARS-CoV-2 serão analisadas utilizando outra pipeline composta por seguintes software BWA v. 0.7.17, GATK v. 4.1.6.0, SnpEff v. 4.3. A filogenia e filogeografia serão reconstituídas utilizando os softwares MAFFT v.7.450, IQ-TREE v.1.6.12, TREE-PUZZLE v. 5.3.rc16, TempEst v. 1.5.3 e BEAST v. 1.10.4. As análises de imuno-bioinformática e predição serão realizadas utilizando linguagens de programação R ou Python.

Desde o início dos primeiros casos da COVID-19 no Brasil, duas frentes de trabalho foram rapidamente estabelecidas no Hemocentro de Ribeirão Preto: o diagnóstico molecular e o tratamento com o uso de plasma convalescente. O diagnóstico da COVID-19 é o elemento fundamental, pois permite a detecção e interrupção da disseminação do vírus, somado ao manejo precoce dos indivíduos infectados. Atualmente, o Brasil ocupa o 2º lugar no ranking mundial de total de casos da COVID-19, e ainda é um dos países que menos realiza testes por milhão de habitantes (895 testes/milhão de habitantes) quando comparado aos países que mais realizam testes como a Suíça (26.293 testes/milhão de habitantes). No Brasil, os testes moleculares têm sido utilizados, entretanto, a demanda e o desabastecimento mundial de insumos, além da falta de infraestrutura para o manuseio de amostras de vírus respiratórios e para a realização de testes moleculares prejudicam o rápido acesso ao diagnóstico. Os ensaios são baseados em sua maioria nos protocolos oficiais preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que utilizam múltiplas regiões virais além de controle endógeno. No Hemocentro de Ribeirão Preto, o diagnóstico molecular (SARS-CoV-2-RT-PCR) foi rapidamente introduzido no início dos primeiros

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.290.583

casos no Brasil para atender a demanda regional e recebeu a certificação pelo Laboratório de Referência do Estado. Desde março de 2020, os testes moleculares são oferecidos somente para pacientes em estado grave na rede pública de saúde. Até o momento, em torno de 3.000 testes foram realizados, com 10-20% de positivos identificados. Uma importante lacuna se refere ao impacto da transmissão transfusional de SARS-CoV-2. Ainda se desconhece o período de viremia e mesmo assim, se a via transfusional seria passível de transmissão viral, além do desdobramento da infecção no receptor. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa propõe avaliar a presença de RNA-SARS-CoV-2 e anticorpos (IgG e IgM) no plasma de doadores de sangue e avaliar o risco transfusional.

A coleta das amostras será baseada em dados do prontuário médico (idade, diagnóstico, exames subsidiários). O nosso intuito é integrar o diagnóstico clínico aos dados moleculares obtidos neste estudo. Para isso, também serão coletadas informações demográficas (idade, gênero, raça/etnia, estado civil e indicadores socioeconômicos), histórico médico (existência de manifestações neurológicas, hematológicas, oftalmológicas, dermatológicas e reumáticas) e laboratorial (marcadores sorológicos e moleculares de co-infecções e hemograma).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A Folha de Rosto foi apresentada estimando-se a participação de 5200 indivíduos, distribuídos da seguinte maneira:

- a) amostras de sangue total de doadores de sangue (n=3.000);
- b) amostras biológicas de swab combinado (nasofaríngee orofarínge, n=2.000);
- c) amostras de plasma de pacientes com COVID-19 (n=200).

Solicita-se a criação de biorepositório vinculado ao estudo.

O documento conta com a anuência do Prof Dr Rodrigo Calado como responsável pela instituição. Ocorre que o referido professor também faz parte da equipe da pesquisa. Deste modo, configura-se conflito de interesse. A anuência da instituição proponente deve ser dada por pessoa que não faça parte da equipe da pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Foram apresentados o orçamento, o cronograma e a declaração de garantia de infraestrutura por parte da instituição para a realização do estudo. Esta declaração também foi assinada pelo

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



**USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -**



Continuação do Parecer: 4.299.983

Professor Rodrigo Caladoe deve ser modificada, conforme já explicado. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

O projeto de pesquisa é relevante e está bem justificado. Entretanto algumas questões precisam ser complementadas ou esclarecidas pela pesquisadora principal:

1) Diz-se na capa do projeto de pesquisa que se trata de projeto de mestrado, porém não foi indicado o nome do aluno(a) de mestrado. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

2) O texto do projeto de pesquisa, assim como o texto do documento informações básicas do projeto de pesquisa precisa ser revisto do ponto de vista gramatical. Por exemplo, de forma recorrente aparece "risco de transfusional" que fica sem sentido no texto. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

3) Dentre os objetivos, os itens 5 e 6 mencionam infecção pelo Zika virus mas que parecem fora do contexto do presente projeto de pesquisa. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

4) Quanto a casuística, há necessidade de se informar de que modo serão selecionados os participantes do estudo? Quais são os critérios de inclusão e exclusão? Haverá a participação de menores de idade? **PENDÊNCIAS ATENDIDAS.**

5) Indaga-se de que modo serão selecionados os participantes? Como será definido o grupo em que se coletará tanto o swab de orofarínge quanto a amostra de sangue? **PENDÊNCIAS ATENDIDAS.**

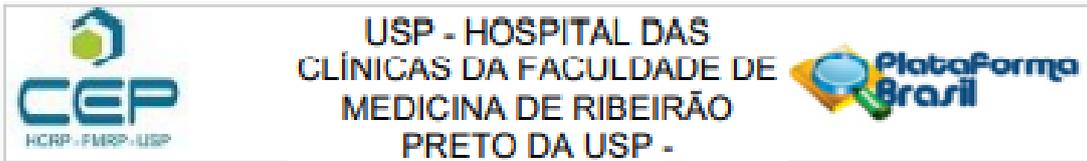
Em relação ao termo de consentimento livre e esclarecido, há necessidade de algumas modificações:

a) A pesquisadora deve apresentar dois termos de consentimento, um dirigido ao grupo de doadores de sangue voluntários e outro dirigido ao grupo de pacientes com infecção pelo COVID 1. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

b) Para aqueles participantes cujos prontuários médicos serão consultados, essa informação precisa constar do termo de consentimento livre e esclarecido. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

c) Há necessidade de se explicar em linguagem acessível o que é swab de orofaringe e de que

<b>Endereço:</b> CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
<b>Bairro:</b> MONTE ALEGRE		<b>CEP:</b> 14.048-900	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> RIBEIRÃO PRETO		
<b>Telefone:</b> (16)3602-2228	<b>Fax:</b> (16)3633-1144	<b>E-mail:</b> cep@hcrp.usp.br	



Continuação do Parecer: 4.299.983

modo é feita a coleta de material por esse método, explicando-se os potenciais riscos e desconfortos da coleta. **PENDÊNCIAS ATENDIDAS.**

d) Em relação à coleta de sangue deve-se explicar que, além do desconforto da picada de agulha, poderá ocorrer mancha roxa no local da picada da agulha de coleta do material. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

e) Deve ser anexada pequena frase explicando o que é o comitê de ética em pesquisa, assim como informar o local e o horário de funcionamento (sugere-se que a pesquisadora entre em contato com a secretaria do Comitê de Ética para obter as informações necessárias. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 02 data 22/09/2020, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico versão 02 data 22/09/2020, podem ser enquadrados na categoria **APROVADO.**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO_1577740.pdf	23/09/2020 16:57:19		Aceito
Parecer Anterior	CARTAPARECERCONSUBSTANCIADO COVID19.pdf	23/09/2020 16:48:19	Elaine Vieira Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID19_2.pdf	23/09/2020 16:47:58	Elaine Vieira Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_swab_COVID19.pdf	23/09/2020 16:47:42	Elaine Vieira Santos	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.299.963

Ausência	TCLE_swab_COVID19.pdf	23/09/2020 16:47:42	Elaine Vieira Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_doadores_COVID19.pdf	23/09/2020 16:46:58	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartaDeCriacaoodeBiorrepositorio_Covid19.pdf	14/08/2020 17:44:45	Elaine Vieira Santos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_Covid19.pdf	14/08/2020 17:37:50	Elaine Vieira Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Covid19_ComitedeÉtica.pdf	14/08/2020 17:37:23	Elaine Vieira Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Covid19.pdf	06/08/2020 22:07:54	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaodeinfraestrutura_Covid19.pdf	03/08/2020 11:54:46	Elaine Vieira Santos	Aceito
Orçamento	Encaminhamento_PROJETOUPC_Covid19.pdf	15/07/2020 16:21:00	Elaine Vieira Santos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_Covid19.pdf	15/07/2020 10:59:29	Elaine Vieira Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 25 de Setembro de 2020

Assinado por:  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

**Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta e guarda de material biológico.**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

**Título da pesquisa:** SARS-CoV-2 E O IMPACTO NA TRANSMISSÃO TRANSFUSIONAL.

**Pesquisadores responsáveis:** Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, Dra. Elaine Vieira Santos e Mariane Evaristo.

**Telefone para contato:** (16) 2101-9300 ramal 9606, 9680 ou 9532.

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é estudar a infecção causada pelo Coronavírus (COVID-19) e melhorar os diagnósticos clínicos de indivíduos acometidos por esta doença. Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) deverá permitir a coleta de uma amostra de sangue total. Não haverá nenhuma despesa, nenhum ganho financeiro e nenhum prejuízo aos indivíduos que participarem deste estudo.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são relacionados à coleta de sangue, por exemplo, um desconforto passageiro devido a picada da agulha. Para minimizar os riscos as coletas serão realizadas por profissionais experientes da área de enfermagem com materiais descartáveis e estéreis.

Os benefícios esperados da pesquisa são de auxiliar-nos a melhorar o diagnóstico clínico em indivíduos infectados pelo coronavírus. No entanto, não existem benefícios diretos aos participantes do estudo.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade para deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar do seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo,

para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado(a) em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa. Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionar pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariaram a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228. Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório **COVID-19** criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de células sanguíneas, DNA, RNA e plasma para complementação diagnóstica e utilização futura em pesquisas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano composto por células sanguíneas, DNA, RNA e plasma para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante o atendimento no Hemocentro de Ribeirão Preto e na Unidade Especial para o Tratamento de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UEDTI-HCFMRP). Após coletado será guardado em biorrepositório localizado no Laboratório de COVID-19 do Hemocentro de Ribeirão Preto, Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Ribeirão Preto, São Paulo, Telefone (16) 2101-9300 ramal 9606, 9680 ou 9532, onde as amostras serão armazenadas por tempo indeterminado. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de células sanguíneas, DNA, RNA e plasma será identificada por meio das iniciais COV e números sequenciais.

Quanto ao material, será coletado 5 mL (1 colher de chá) de sangue. Em decorrência da coleta pode ocorrer um desconforto passageiro devido a picada da

agulha ou o aparecimento de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta do material. Para amenizar os riscos e desconfortos será realizada a compressão local e se necessário o uso de compressas frias para atenuar a dor local.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Sua autorização será solicitada, se necessário, para o descarte do material armazenado em caso de amostras coaguladas ou com hemólise.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

**Dados do participante:**

Nome: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,

Endereço: \_\_\_\_\_,

nº \_\_\_\_\_, Bairro \_\_\_\_\_, cidade \_\_\_\_\_, telefone  
\_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_