



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Ana Julia Chaves Gomes

Análise da positividade dos vírus influenza A/B associados a casos de mono e coinfecção entre o SARS-CoV-2

São José do Rio Preto

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Análise da positividade dos vírus influenza A/B associados a casos de mono e coinfecção entre o SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP, SP.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Coorientador: Dr. Vivaldo Gomes da Costa

São José do Rio Preto

2023

G633a

Gomes, Ana Julia Chaves

Análise da positividade dos vírus influenza A/B associados a casos de mono e
coinfecção entre o SARS-CoV-2 / Ana Julia Chaves Gomes. -- São José do Rio Preto,
2023

48 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José
do Rio Preto

Orientadora: Paula Rahal

Coorientador: Vivaldo Gomes da Costa

1. SARS-CoV-2. 2. Vírus influenza tipo A e B. 3. Pandemia de COVID-19. I. Título.

Análise da positividade do vírus influenza A/B associados a casos de mono e coinfecção entre o SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP, SP.

Comissão Examinadora

Data da apresentação: 26/01/2023

Profa. Dra. Paula Rahal

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Orientadora

Dr. Vivaldo Gomes da Costa

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Coorientador

Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Membro Titular

MSc. Marielena Vogel Saivish

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Membro Titular

MSc. Carolina Gismene

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Suplente

São José do Rio Preto

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Tânia e Edir, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e sonhos e se mantiveram ao meu lado nos tempos difíceis.

Aos meus amigos que me proporcionaram momentos de felicidade e apoio nos momentos de tristeza.

A minha professora orientadora, Profa. Dra. Paula Rahal, por ter me dado a oportunidade de participar do laboratório e vivenciar momentos incríveis, e pelo conhecimento compartilhado, correções e incentivos.

Ao meu coorientador, Vivaldo G. Costa, por ter me ajudado em momentos difíceis e compartilhado todo o seu conhecimento e vivência.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório de Estudos Genômicos, por me receberem e por manterem um ambiente amigável.

Ao IBILCE, por me oferecer um ambiente de estudos e oportunidades.

E ao projeto Corona-Ômica BR MCTI/FINEP afiliada à Rede Vírus/MCTI (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4) pelo suporte no meu estudo.

RESUMO

Os vírus influenza A e B ocasionam surtos, epidemias de gripe sazonal e pandemias. No Brasil, geralmente, ocorre epidemia sazonal de gripe entre abril e outubro. As epidemias acontecem justamente pela capacidade dos vírus influenza sofrerem mutações antigênicas, acarretando diminuição da resposta imune celular. A vista disso, em 2019 houve notificação de 39.190 casos confirmados de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), incluindo 5.714 casos de influenza com predomínio dos vírus influenza A H1N1 (pdm09) (3.399), seguido de influenza A H3N2 (894), influenza A não subtipado (772) e influenza B (694). Possivelmente, o fator contribuinte para esse cenário de transmissão rápida foi a baixa cobertura vacinal nos últimos dois anos no país, com 71,2% do grupo alvo vacinado em 2021 e 82% em 2020. De fato, no final de 2021 a situação tornou-se ainda mais preocupante diante do aparecimento dos surtos com a nova cepa do subtipo A (H3N2), durante a pandemia de SARS-CoV-2. Esse panorama nos despertou o interesse e mostrou a relevância em se pesquisar subnotificações dos vírus influenza nos casos clínicos suspeitos da COVID-19. Para o monitoramento epidemiológico e controle de casos clínicos tornou-se importante determinar a positividade dos vírus influenza A e B em amostras com resultados de RT-PCR em tempo real negativas e positivas para o SARS-CoV-2. Consequentemente, amostras nasofaríngeas de profissionais da saúde e contactantes com suspeita clínica de COVID-19, oriundas do município de São José do Rio Preto-SP, e representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19, foram incluídas no presente estudo. Um total de 901 amostras nasofaríngeas fizeram parte da triagem laboratorial, resultando em 81.3% (733/901) de negatividade para o SARS-CoV-2. Dentre essas amostras negativas, houve 1.9% (14/733) de positividade para o vírus influenza A, enquanto 0.13% (1/733) foram positivas para o vírus influenza B. Em relação as amostras SARS-CoV-2 positivas, o índice de coinfeção foi de 1.7% (3/168) para o vírus influenza A. Dados de análise da associação da positividade viral relacionado ao sexo, idade e período de coleta, mostraram associação negativa entre a faixa etária de 10-19 anos com a infecção pelo SARS-CoV-2 ($p < 0,01$). Em suma, os dados evidenciam a circulação dos vírus influenza A e B entre as amostras de indivíduos com suspeita clínica de COVID-19. Portanto, os dados aqui gerados contribuem na determinação do perfil epidemiológico destes vírus na presente região de estudo.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. Vírus influenza tipo A e B. Pandemia de COVID-19

ABSTRACT

Influenza A and B viruses cause outbreaks, seasonal flu epidemics, and pandemics. In Brazil, there is usually a seasonal flu epidemic between April and October. Epidemics occur precisely because of the ability of influenza viruses to undergo antigenic mutations, leading to a decrease in the cellular immune response. In the period of 2019, there were 39,190 confirmed cases of severe acute respiratory syndrome (SARI), including 5,714 cases of influenza with a predominance of influenza A H1N1 (pdm09) viruses (3,399), followed by influenza A H3N2 (894), influenza A non-subtyped (772) and influenza B (694). Possibly, the contributing factor to this scenario of rapid transmission was the low vaccination coverage in the last two years in the country, with 71.2% of the target group vaccinated in 2021 and 82% in 2020. In fact, at the end of 2021, the situation became even more worrying given the appearance of outbreaks with the new strain of subtype A (H3N2), during the SARS-CoV-2 pandemic. This panorama aroused our interest and showed the relevance in investigating underreporting of influenza viruses in suspected clinical cases of COVID-19. For epidemiological monitoring and clinical case control, it has become important to determine the positivity of influenza A and B viruses in samples with negative and positive real-time RT-PCR results for SARS-CoV-2. Consequently, nasopharyngeal samples from health professionals and contacts with clinical suspicion of COVID-19, from the municipality of São José do Rio Preto-SP, and representative of the first epidemic wave of COVID-19, were included in the present study. A total of 901 nasopharyngeal specimens were part of the laboratory screening, resulting in 81.3% (733/901) negativity for SARS-CoV-2. Among these negative samples, there were 1.9% (14/733) positivity for the influenza A virus, while 0.13% (1/733) were positive for the influenza B virus. Regarding the positive SARS-CoV-2 sample, the co-infection rate was 1.7% (3/168) for the influenza A virus. Data from the analysis of the association of viral positivity related to sex, age and collection period, showed a negative association between the age group of 10-19 years with SARS-CoV-2 infection ($p < 0,01$). In short, the data show the circulation of influenza A and B viruses among samples from individuals with clinical suspicion of COVID-19. Therefore, the data generated here contribute to the determination of the epidemiological profile of these viruses in the present region of study.

Keywords: SARS-CoV-2. Influenza viruses type A and B. COVID-19 pandemic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das soluções de extração de RNA nas placas do robô de extração.....	30
Tabela 2 - Quantidade de reagentes necessários para a solução de lise durante a extração de RNA.....	30
Tabela 3 - Ciclo do robô de extração UniXtractor.....	31
Tabela 4 - Ensaio duplex contendo os primers e sondas dos vírus influenza A/B.....	31
Tabela 5 - Medida do ciclo de quantificação do sinal de fluorescência no PCR em tempo real	32
Tabela 6 - Análise da incidência da COVID-19 entre os grupos: sexo, idade e mês de triagem das amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19.....	34
Tabela 7 - Análise da incidência de influenza A/B entre os grupos: sexo, idade e mês de triagem das amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19.....	35
Tabela 8 - Análise da incidência de coinfeção entre os vírus influenza A/B e SARS-CoV-2 entre as amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19.....	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Arranjo genômico do SARS-CoV-2.....	13
Figura 2 - Estrutura viral do SARS-CoV-2.....	14
Figura 3 - Ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2.....	15
Figura 4 - Uma breve linha do tempo.....	16
Figura 5 - Estrutura da partícula do vírus influenza.....	18
Figura 6 - Ciclo de replicação do vírus influenza.....	22
Figura 7 - Uma breve linha do tempo das pandemias.....	23
Figura 8 - Curva de monitoramento do sinal de fluorescência no PCR em tempo real.....	33

LISTAS DE ABREVIACÕES

COVID-19	- Coronavirus disease 2019
InfA	- Vírus influenza A
InfB	- Vírus influenza B
InfC	- Vírus Influenza C
InfD	- Vírus influenza D
SARS-CoV-2	- <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
ssRNA	- <i>Single-stranded RNA viruses</i>
ORF	- <i>Open Reading Frame</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Características gerais do SARS-CoV-2	12
1.1.1. Histórico e epidemiologia do SARS-CoV-2	16
1.2. Características gerais do vírus influenza	17
1.2.1. Histórico e epidemiologia do vírus influenza	22
1.3. Sintomatologia e formas de transmissão dos vírus influenza e SARS-CoV-2	24
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Aspectos Éticos	28
4.2. Local de Estudo, Infraestrutura, Equipamentos e Recursos Financeiros	29
4.3. Extração do RNA	29
4.4. PCR em tempo real duplex	32
4.5. Análise Estatística	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os vírus respiratórios, transmitidos por contato direto ou indireto, gotículas ou aerossóis, causam graus variados de infecções respiratórias agudas, as quais são reconhecidas mundialmente pelo elevado número de casos e por sua mortalidade (MURUGANANDAM *et al.*, 2022). A cada século ocorrem entre 290.000 e 650.000 mortes associadas à influenza sazonal (OPAS, 2017; IULIANO *et al.*, 2018). Nesse século, porém, outros vírus respiratórios tiveram o seu devido destaque, incluindo o vírus da síndrome respiratória aguda grave Coronavírus (SARS-CoV), síndrome respiratório do Oriente Médio Coronavírus (MERS-CoV) e SARS-CoV-2, o agente etiológico da doença Coronavírus 2019 (COVID-19) (WIT *et al.*, 2016; HARAPAN *et al.*, 2020; FLERLAGE *et al.*, 2021).

Dentre as pandemias que assolaram a humanidade nos últimos 100 anos, destacam-se as ocasionadas pelo vírus influenza A (InfA) (GEHA *et al.*, 2021). Em 1918 e 1920, a influenza A (H1N1), tornou-se responsável pela chamada gripe espanhola, com milhões de mortes globalmente (GEHA *et al.*, 2021). Nos anos posteriores, a constante remodelação e mutabilidade antigênica do vírus influenza ocasionou novos cenários pandêmicos, como em 1957 que uma nova cepa de Influenza (H2N2) ocasionou surtos epidêmicos em diversas regiões do planeta; em 1968, onde a linhagem H3N2 recriou o mesmo cenário com a gripe de Hong Kong; e por fim, em 2009, a cepa A(H1N1)pdm09, teve seus primeiros casos notificados no México (GEHA *et al.*, 2021).

Apesar do vírus influenza ser considerada a infecção que mais causou mortes, a partir de 2019, o SARS-CoV-2 tem causado uma nova pandemia, com alta patogenicidade (FLERLAGE *et al.*, 2021). A COVID-19 teve seu primeiro caso relatado no período de dezembro de 2019 em Wuhan, China (ANDERSEN *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020). Desde então, mais de 500 milhões de casos de COVID-19 foram confirmados e 6,2 milhões morreram em decorrência da doença (JHU, 2022). Como muitos dos casos iniciais de COVID-19 estavam ligados ao mercado de Huanan em Wuhan, levantou-se a suspeita de que uma fonte animal estivesse ligada a esse vírus (ANDERSEN, 2020; LIMA *et al.*, 2020).

No final de 2021 a situação diante desse vírus mostrou-se ainda mais preocupante diante do aparecimento dos surtos com a nova cepa do subtipo A (H3N2), durante a pandemia de SARS-CoV-2. Os pesquisadores especularam sobre

a possibilidade de coinfeção por ambos os vírus desde o início da pandemia de COVID-19 (AKHTAR *et al.*, 2021). Yue *et al* relataram uma alta taxa de coinfeção de SARS-CoV-2 e vírus influenza: 49,8% para influenza A e 7,5% para influenza B no estágio inicial da pandemia. No entanto, a temporada de gripe durante 2019–2020 terminou muito cedo na China em comparação com os anos anteriores, e houve um declínio acentuado da circulação da influenza nos EUA e em vários países asiáticos do Hemisfério Norte, inclusive em Bangladesh (AKHTAR *et al.*, 2021). Observações semelhantes também foram relatadas nos países do Hemisfério Sul da Austrália, Chile, África do Sul e Nova Zelândia (AKHTAR *et al.*, 2021). Esse declínio na atividade do vírus influenza pode ser atribuído a muitos fatores, incluindo o surto substancial de SARS-CoV-2 como uma pandemia global, o qual proporcionou medidas não farmacêuticas, como máscaras, fechamento de escolas, distanciamento social e esforços de saúde pública para controlar a disseminação do vírus (AKHTAR *et al.*, 2021; KRIGER *et al.*, 2022).

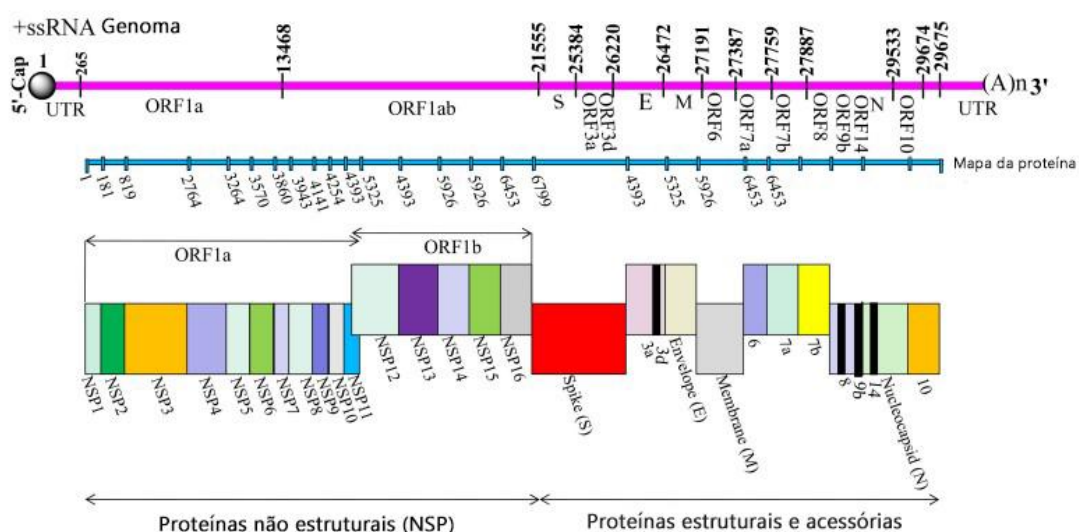
Com o avanço da vacinação e diminuição da incidência de novos casos de COVID-19, diversos países começaram a suspender a obrigatoriedade do uso de máscaras e outras medidas para controlar o vírus. Diante disso, os casos de coinfeção entre novas cepas de SARS-CoV-2 e do vírus influenza voltaram a ser uma preocupação global. Portanto, dados válidos sobre a taxa de coinfeção são de extrema importância para o controle dessas doenças.

1.1. Características gerais do SARS-CoV-2

A família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, inclui vírus envelopados, genoma de RNA fita simples e de sentido positivo, com o tamanho do genoma variando de 26 mil a 30 mil pares de base (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Esta família também é classificada em pelo menos quatro gêneros (alfa, beta, gama e delta), nos quais sete vírus, atualmente, são conhecidos por infectar humanos: NL63 e 229E do gênero alfa; e OC43, HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 do gênero beta (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2021). Após o surgimento do SARS-CoV em 2002, vários coronavírus semelhantes foram identificados nas populações de morcegos (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; ANDERSEN *et al.*, 2020). Esta subfamília de vírus possui uma característica única estrutural em sua superfície que se assemelha a uma coroa solar, a presença de proteínas *spike* na superfície do vírus (YANG *et al.*, 2021).

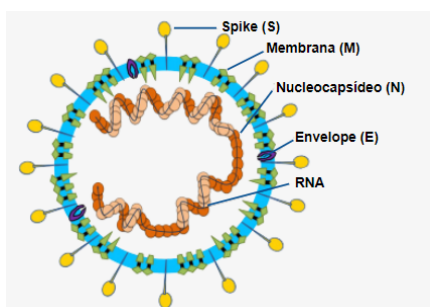
A organização genômica do SARS-CoV-2, representada na Figura 1, assemelha-se a outros coronavírus, variando de 26,0 kb a 32,0 kb (YADAV *et al.*, 2021; BAKHIET; TAURIN, 2020). Logo, apresentam quatro principais proteínas estruturais que estão localizadas na região que precede a extremidade 3' do genoma, incluindo *spike* (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N) (YADAV *et al.*, 2021; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020) (Figura 2). Possuem as seguintes funções: fixação e entrada na célula alvo (S); empacotamento e organização do genoma viral (N); montagem do vírion (M, E, N); e liberação do vírion (E) (YADAV *et al.*, 2021; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Dois terços da região genômica viral, ou seja, 20 kb iniciais a jusante da extremidade 5', ocupam o gene da replicase referido como Open Reading Frame 1a e ab (ORF1ab) que codificam as proteínas não estruturais (NSP), como NSP1. Soma-se ainda, a existência de outras nove proteínas acessória codificadas pelos genes: ORF3a; 3d; 6; 7a; 7b; 8; 9b; 14; e 10 (YADAV *et al.*, 2021; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Essas proteínas, juntamente com as NSPs, desempenham papel muito importante na replicação viral (YADAV *et al.*, 2021). Os coronavírus apresentam o maior genoma de qualquer vírus de RNA e usam uma estratégia de replicação, incluindo frameshifting ribossômico e geração de RNAs subgenômicos (que predispõe a eventos de recombinação proporcionando uma capacidade de desenvolver uma nova especificidade do hospedeiro) (FLERLAGE *et al.*, 2021).

Figura 1. Arranjo genômico do SARS-CoV-2. A organização genômica do SARS-CoV-2 mostra o arranjo sequencial de vários genes não estruturais, estruturais e acessórios.



Fonte: Adaptado de YADAV, Rohitash *et al.* Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, 6 abr. 2021.

Figura 2. Estrutura viral do SARS-CoV-2. Os coronavírus possuem um nucleocapsídeo composto de RNA genômico e proteína do nucleocapsídeo (N), que está dentro de bicamadas fosfolipídicas, a qual é coberta por proteínas Spike (S). A proteína de membrana (M) está embebida na bicamada fosfolipídica.

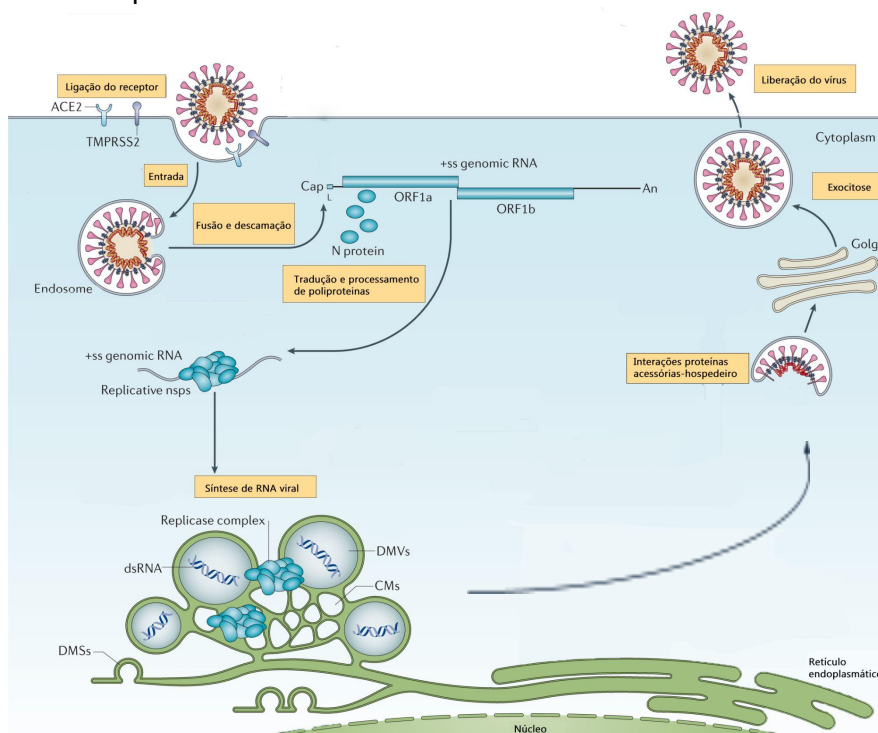


Fonte: Adaptado de Li G *et al.* Coronavirus infections and immune responses. J Med virol, 2020, 92(4):424-432.

A replicação do SARS-CoV-2, representado na Figura 3, começa quando a proteína estrutural S transmembrana se liga ao seu receptor, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), na célula hospedeira (BAKHIE; TAURIN, 2020; YANG *et al.*, 2020). Diferentemente dos outros coronavírus que utilizam receptores convencionais, como a aminopeptidase-N (APN; HCoV-229E) e dipeptil peptidase-4 (DPP4; MERS-CoV), o SARS-CoV-2 e até mesmo o SARS-CoV compartilham o mesmo receptor celular, o ACE2, para a sua entrada (BAKHIE; TAURIN, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2020). As proteínas S de coronavírus são glicoproteínas de fusão homotriméricas de classe I e são divididas em duas partes funcionalmente distintas, S1 e S2 (V'KOVSKI *et al.*, 2020). O S1 exposto à superfície contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) que engaja o receptor da célula hospedeira (V'KOVSKI *et al.*, 2020). Já o domínio S2 da transmembrana contém regiões capazes de mediar a fusão de membrana virais e celulares após extensos rearranjos conformacionais (V'KOVSKI *et al.*, 2020). Além dessa ligação ao receptor, a clivagem proteolítica das proteínas S por proteases derivadas da célula hospedeira é essencial para permitir que a fusão ocorra, isto é, a ligação do RBD da subunidade S1 com o domínio peptídico ACE2 desencadeia uma clivagem na junção S1/S2 da proteína *spike* por proteases celulares como a furina ou proteases endossomais, expondo um sítio secundário (S2'), o qual posteriormente é clivado pela serina protease 2 transmembrana (TMPRSS2) revelando o peptídeo de fusão da subunidade S2 (BAKHIE; TAURIN, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2020). Essa última clivagem permite que a subunidade S2 se insira na membrana do hospedeiro e guie a fusão das membranas viral e celular (V'KOVSKI *et al.*, 2020).

Após a entrada do vírus, o RNA viral é liberado no citoplasma, sem revestimento, permitindo a iniciação da tradução imediata de ORF1a e ORF1b (BAKHIEI; TAURIN, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2020). As poliproteínas resultantes, pp1a e pp1ab, são processadas, sob a coordenação de proteases virais como Mpro (nsp5) e PLpro (nsp3), em proteínas não estruturais individuais (nsps) (BAKHIEI; TAURIN, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2020). Concordante com a expressão de nsps, a biogênese das organelas de replicação viral consistindo em vesículas de membrana dupla perinucleares (DMVs), membranas convolutas (CMs) e pequenas esférulas de membrana dupla abertas (DMSs) criam um microambiente protetor para o RNA genômico viral (V'KOVSKI *et al.*, 2020). As proteínas estruturais traduzidas, agora, movimentam-se para as membranas do retículo endoplasmático e transitam através dos compartimentos para o aparelho de Golgi, resultando no brotamento no lúmen de compartimentos vesiculares contendo os vírions que serão posteriormente secretados da célula infectada por exocitose (V'KOVSKI *et al.*, 2020).

Figura 3. Ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2. As partículas de coronavírus se ligam a fatores de ligação celular e interações específicas com os receptores celulares (enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), juntamente com fatores do hospedeiro (serina protease da superfície celular TMPRSS2). Após a entrada, há tradução imediata de dois grandes quadros de leitura aberta, ORF1a e ORF1b. Proteínas estruturais traduzidas translocam-se para as membranas do retículo endoplasmático (RE) e transitam através do compartimento intermediário RE-Golgi. Finalmente, os vírions são secretados da célula infectada por exocitose.



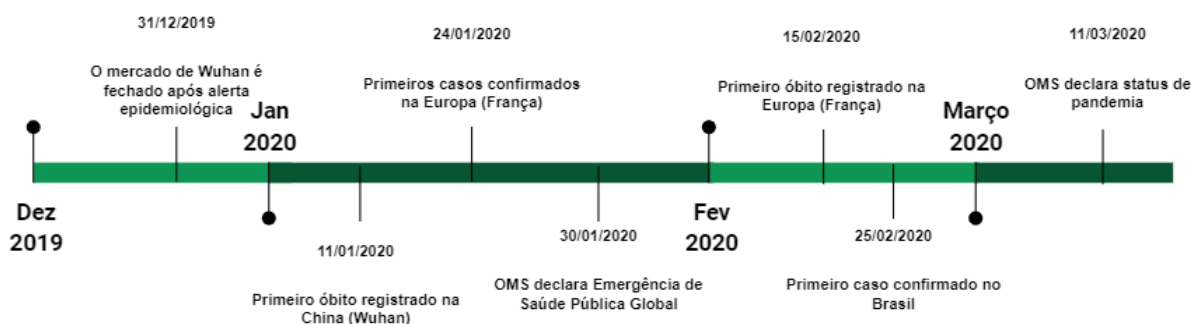
Fonte: Adaptado de V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155–170 (2021).

1.1.1. Histórico e epidemiologia do SARS-CoV-2

No dia 8 de dezembro de 2019, um grupo de pacientes que viviam em torno ou trabalhavam no Mercado Grossista de Frutos do Mar de Huanan foram relatados com sintomas agudos associados à pneumonia em Wuhan, província de Hubei, China (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; MURALIDAR *et al.*, 2020). Mais tarde o Centro Chinês de Doenças Controle e Prevenção detectou o novo coronavírus da amostra de *swab* da garganta de uma pessoa hospitalizada. Em 13 de janeiro de 2020, o Ministério da Saúde Pública da Tailândia, o Ministério da Saúde Trabalho e Bem-Estar do Japão e RSI Nacional Ponto Focal (NFP) da República da Coreia relataram seu primeiro caso de COVID-19, notavelmente, importados de Wuhan, China (MURALIDAR *et al.*, 2020). Seguidamente, os casos de SARS-CoV-2 também foram relatados nos Estados Unidos da América e em Hong Kong, onde todos esses casos tinham histórico de viagem para Wuhan (MURALIDAR *et al.*, 2020).

Em 20 de Janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS), portanto, divulgou um relatório de situação para a pandemia de COVID-19 indicando 282 casos confirmados laboratorialmente e 6 mortes em todo o mundo que aumentaram drasticamente para 21.294.845 casos confirmados laboratorialmente e 761.779 mortes em 16 de agosto de 2020 (MURALIDAR *et al.*, 2020). Oficialmente, a OMS declarou a infecção por COVID-19 como uma pandemia em 11 de março de 2020 (MURALIDAR *et al.*, 2020). A Figura 4 mostra uma breve linha do tempo dos principais eventos que antecederam a pandemia da COVID-19.

Figura 4. Uma breve linha do tempo. Uma breve linha do tempo dos principais eventos que antecederam a pandemia da COVID-19.



Fonte: Uma breve linha do tempo – Coronavírus Litoral – UFRGS. Adaptado

Inicialmente, o Grupo de Estudo *Coronaviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus identificou o SARS-CoV-2, um protótipo humano, como um clado irmão da síndrome respiratória aguda grave de morcegos (SARS-CoVs) (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Mais tarde, a análise genômica do SARS-CoV-2 indicou que ele é um membro do gênero *Betacoronavirus* e se enquadra no subgênero *Sarbecovirus*, que também inclui o SARS-CoV (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Porém, revelou que seis proteínas de replicase (ORFs) principais compartilham menos de 80% de sequência nucleotídica com SARS-CoV e sete domínios de replicase conservadas na sequência de aminoácidos ORF1ab compartilham 94,4% de identidade com esse mesmo vírus (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

Ainda, diferenças significativas entre o SARS-CoV e SARS-CoV-2 foram observadas na sequência do gene S do SARS-CoV-2, incluindo três inserções curtas do domínio N-terminal e mudanças em quatro de cinco resíduos cruciais no motivo de ligação do receptor, além da presença de um Sítio de Clivagem Polibásico, na ligação das subunidades S1/S2 da glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; ANDERSEN *et al.*, 2020; HOFFMANN *et al.*, 2020). Por fim, a análise genômica revelou que o genoma do SARS-CoV-2 é altamente semelhante (96,2%) ao do coronavírus de morcego (Bat CoV RaTG13), além de, a ligação do receptor da proteína *spike* compartilhar 93,1% de similaridade com Bat CoV RaTG13 (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

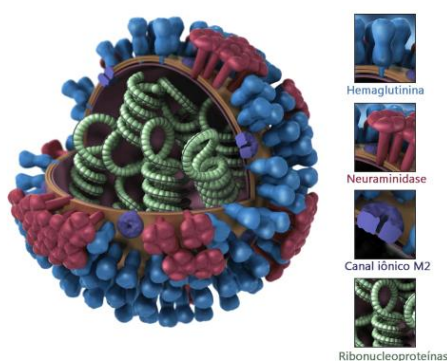
Dada a análise, foi concluído que morcegos provavelmente são os hospedeiros reservatórios desse vírus. No entanto, suas diferenças biológicas gerais em relação aos humanos tornam possível que outras espécies de mamíferos também atuaram como hospedeiros intermediários, nos quais o SARS-CoV-2 obteve algumas mutações necessárias para a eficácia humana (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; ANDERSEN *et al.*, 2020).

Atualmente com o surgimento de novas cepas do SARS-CoV-2, novas vacinas podem precisar ser desenvolvidas regularmente e será necessária uma maior penetração da vacina para construir uma imunidade protetora (KUMAR *et al.*, 2021).

1.2. Características gerais do vírus influenza

Os vírus influenza são envelopados e pertencem à família *Orthomyxoviridae*, sendo classificados em quatro gêneros que incluem os vírus influenza A-D (InfA, InfB, InfC e InfD) conforme diferenças antigênicas em suas proteínas, tais como a proteína de matriz (M1) e a nucleoproteína (N) (FLERLAGE *et al.*, 2021; HAUSE *et al.*, 2014; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Seu genoma é composto por oito segmentos diferentes, sendo que cada segmento contém uma região que codifica uma ou duas proteínas com funções específicas. Entre elas a hemaglutinina (HA) - possibilita a ligação do vírus aos receptores de ácido siálico da célula hospedeira e a fusão entre as membranas viral e endossomal para a entrada do vírus na célula, e a neuraminidase (NA) – facilita a saída das partículas virais do interior das células infectada. Outras proteínas como, polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2), a nucleoproteína (N), proteína não estrutural (NS1) e a proteína ácida polimerase (PA) – são responsáveis pela replicação e transcrição do RNA viral, e a matriz (M1) – preenche o interior viral, algumas destas estão representadas na Figura 5 (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; LOBO, 2015).

Figura 5. Estrutura da partícula do vírus influenza. Os InfA são classificados em subtipos com base nas propriedades das proteínas de superfície hemaglutinina (H ou HA) e neuraminidase (N ou NA). Existem 18 subtipos diferentes de HA e 11 subtipos de NA. Os subtipos são designados combinando as quantidades de HA e NA.



Fonte: Center of Disease Control and Prevention, 2022. Adaptado.

A nomenclatura do vírus influenza é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) incluindo, na seguinte ordem, o tipo de vírus, a origem geográfica do primeiro isolado, o número da linhagem, o ano de isolamento e o subtipo do vírus (WHO, 1980; LOBO, 2015). No caso do tipo A, por exemplo, a descrição dos antígenos de superfície do vírus é apresentada entre parênteses, como, por exemplo, A/Sydney/5/97(H3N2) (WHO, 1980; LOBO, 2015).

No que diz respeito a saúde humana os InfA e InfB são a principal preocupação; os InfC são endêmicos e causam uma doença respiratória leve ou uma infecção assintomática em humanos; e os InfD causam principalmente infecção em bovinos (FLERLAGE *et al.*, 2021; HAUSE *et al.*, 2014). Anualmente, os InfA ocasionam epidemias sazonais e são subtipadas com base em duas glicoproteínas de superfície, a HA e a NA - Dezesesseis HAs e nove NAs foram descritos em espécies aviárias, o principal reservatório animal natural dos vírus influenza; dois HAs e NAs adicionais foram descritos em morcegos; e os IAVs H1N1 e H3N2 atualmente causam a maioria das doenças epidêmicas em humanos (FLERLAGE *et al.*, 2021; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

Os vírus da gripe A exibem propriedades antigênicas que promovem alteração no seu genoma: drift e shift, permitindo-lhes evitar a resposta imune do hospedeiro. As alterações antigênicas graduais (antigenic drift) envolvem pequenas mudanças em HA e NA ao longo do tempo (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; LOBO, 2015). Por outro lado, alterações bruscas (antigenic shift) resultam em uma substituição do segmento de RNA de diferentes linhagens de influenza animal e humana, isto é, ocorre um rearranjo genético repentino entre dois ou mais genes próximos (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; LOBO, 2015).

O triplo rearranjo que ocorreu no vírus influenza A pdm09 e causou a pandemia de 2009 como resultado da substituição dos genes hemaglutinina H2 e polimerase PB1 do vírus aviário H2N2 por dois novos é um bom exemplo das alterações genéticas causadas pelos vírus que podem gerar novos subtipos virais (são responsáveis por reduzir potencialmente a eficácia das vacinas) (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020; LOBO, 2015). O vírus sofreu rearranjo e apresentava segmentos gênicos de vírus suínos, aviários e humanos (DUTRA, 2017). Os genes NA e M foram derivados de vírus suíno de origem aviária da Eurásia e os 6 segmentos restantes foram provenientes de rearranjo triplo de vírus suínos, sendo genes de vírus clássico H1N1 de suínos, vírus norte americano aviário e vírus H3N2 de humanos (DUTRA, 2017).

Os InfB, por outro lado, são restritos aos humanos e são classificados em duas linhagens circulantes (B/Victoria e B/Yamagata) (SANDT *et al.*, 2015). Tanto o InfA quanto o InfB expressam um canal iônico (M2), essencial para a liberação do material genético do vírus no citoplasma. Embora difiram em seus respectivos tamanhos e revestimento do poro do canal, o poro do InfA é revestido com

aminoácidos hidrofóbicos, já os do InfB são revestidos com serinas polares (SANDT *et al.*, 2015).

A replicação do vírus influenza, representada na Figura 6, começa quando as proteínas de superfície HA se ligam ao ácido siálico encontrado na superfície da membrana da célula hospedeira (SHAO *et al.*, 2017; SAMJI, 2009). Duas principais ligações são encontradas nessa etapa, α (2,3) e α (2,6), às quais são extremamente importantes para a especificidade das moléculas de HA na ligação aos receptores de ácido siálico da superfície celular encontrados em diferentes espécies (SAMJI, 2009). Ambas glicoproteínas, NA e HA, têm afinidade pelos ácidos siálicos, mas têm efeito oposto na liberação do vírus das células (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). A HA liga o vírus à membrana celular devido à sua interação com os receptores contendo ácido siálico e a NA é necessária para remover os ácidos siálicos, a fim de permitir que o vírus deixe suas células hospedeiras (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

Após essa ligação, os vírus são internalizados em compartimentos endocíticos mediada principalmente por clatrina (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). Já que o endossoma possui um pH baixo que varia entre 5 e 6, este desencadeia a alteração da estrutura da HA, a qual se torna suscetível a digestão por proteases. Como consequência, a HA é clivada em duas subunidades: HA1 e HA2, conectadas entre si por pontes dissulfeto. A HA1 tem um domínio funcional que se liga ao receptor da célula hospedeira, e a HA2 é uma subunidade importante que medeia a fusão do vírus com a membrana da célula (SAMJI, 2009; SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014; SHAO *et al.*, 2017). Esse ambiente ácido também é responsável por ativar o canal iônico M2 (proteína tipo III que forma tetrâmeros, cujos domínios transmembrana formam um canal que atua como um canal seletivo de prótons), o qual possui um papel importante na liberação do material genético do vírion mediando o influxo de íons H⁺ do endossoma para a partícula viral já que enfraquece a interação entre a ribonucleoproteína e a proteína M1 da matriz (SAMJI, 2009; SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

Como consequência desses processos, o material genético do vírion é liberado no citoplasma da célula hospedeira (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). Ao contrário de muitos outros vírus de RNA, a replicação e a transcrição do vírus influenza são realizadas no núcleo da

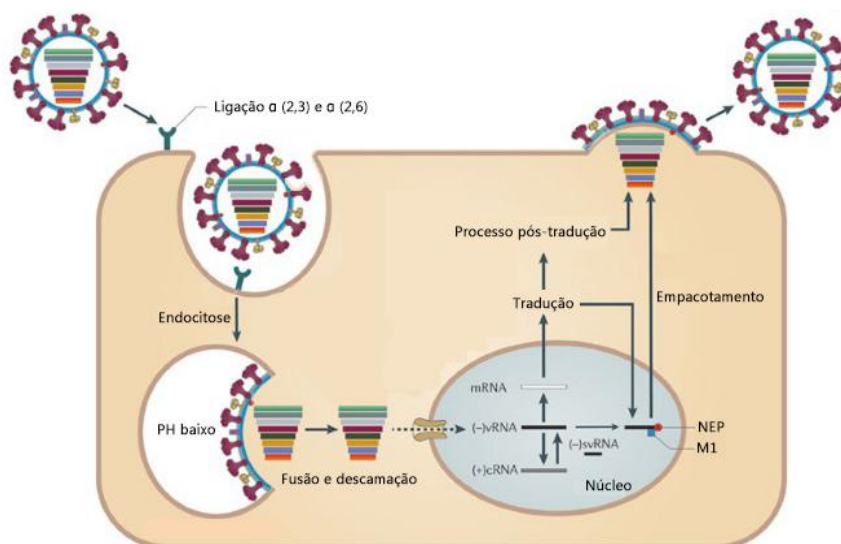
célula hospedeira (SHAO *et al.*, 2017). Para isso, proteínas pertencentes à família das alfas importinas reconhecem sinais de localização nuclear (NLS) na nucleoproteína (NP), desempenhando um papel importante no transporte de complexos de RNA (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

Uma vez no núcleo, o ssRNA genômico de polaridade negativa é usado como molde para a síntese de duas classes de ssRNA de polaridade positiva: RNAs mensageiros (mRNAs) e cópias complementares completas (cRNAs) (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). Durante a transcrição, a polimerase viral multimérica interage com a polimerase II da célula hospedeira levando a um fenômeno conhecido como *cap-snatching*, que é a remoção de um cap dos mRNAs recém-sintetizados (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). A última etapa da replicação dos segmentos genômicos envolve a cópia do RNA viral no modelo de RNAs complementares (cRNA), a qual geram complexos ribonucleoprotéicos (RNP) (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

Por fim, a proteína M1 e a proteína NS2 (também chamada de proteína de exportação nuclear NEP) desempenham um papel vital na translocação desses complexos para o citoplasma, onde ocorrerá a montagem de componentes virais em jangadas lipídicas (estruturas lipídicas não iônicas, ricas em esfingolipídios, que residem no interior da membrana plasmática) (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). Esse local é crucial para a incorporação das glicoproteínas HA e NA, as quais antes de serem direcionadas para as jangadas lipídicas sofrem modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

No retículo endoplasmático, agora, essas proteínas tornam-se corretamente enoveladas e glicosiladas e no complexo de Golgi, sofrem modificações subsequentes das cadeias de glicano e esterificação com ácidos graxos (SZEWCZYK; BIEŹKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014). O empacotamento se completa com o fechamento da membrana plasmática, liberando o vírus.

Figura 6. Ciclo de replicação do vírus influenza. Nos estágios iniciais da replicação do InfA, o HA viral liga-se aos receptores da célula hospedeira que contêm ácido siálico ligado a α (2,6) e ácido siálico ligado α (2-3) e o vírus entra na célula por endocitose mediada por receptor. Ocorre posteriormente a clivagem de HA por proteases para expor o peptídeo HA que é responsável pela fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal. Os complexos de ribonucleoproteínas se translocam para o núcleo, onde a RNA polimerase dependente de RNA transcreve e replica o RNA viral de sentido negativo ((-)vRNA), dando origem a três tipos de moléculas de RNA: o RNA complementar de sentido positivo ((+)cRNA), que usa como modelo para gerar mais vRNA; pequenos RNAs virais de sentido negativo (svRNAs) e os mRNAs virais, que são exportados para o citoplasma para tradução. As proteínas virais que são necessárias na replicação e transcrição são translocadas de volta para o núcleo, e os RNPs descendentes são então exportados para o citoplasma para empacotamento, comandados por M1 e NEP. Os HA, NA e M2 virais são transportados pela via secretora trans-Golgi, e as proteínas maduras chegam à membrana plasmática, onde o M1 auxilia na formação das partículas virais. A liberação das células hospedeiras é mediada pela atividade da neuraminidase de NA, que destrói o ácido siálico das glicoproteínas celulares e virais.



Fonte: Adaptado de Medina, R., García-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 9, 590–603 (2011).

1.2.1. Histórico e epidemiologia do vírus influenza

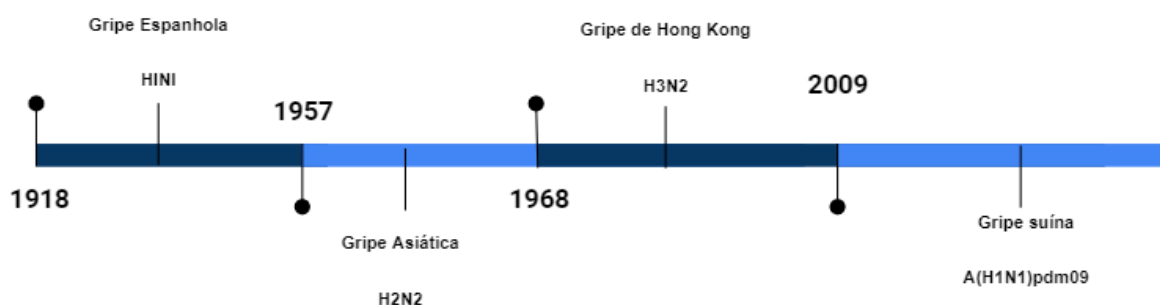
Os InfA e InfB ocasionam surtos, epidemias de gripe sazonal e pandemias. No Brasil, geralmente, ocorre epidemia sazonal de gripe entre abril e outubro. As epidemias acontecem justamente pela capacidade dos vírus influenza sofrerem mutações antigênicas, acarretando diminuição da resposta imune celular (FLERLAGE *et al.*, 2021). No período de 2019, houve notificação de 39.190 casos confirmados de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), incluindo 5.714 casos de influenza com predomínio do InfA H1N1 (pdm09) (3.399), seguido de influenza A H3N2 (894), influenza A não subtipado (772) e influenza B (694) (RIBEIRO *et al.*, 2020). No entanto, todo ano, estima-se que haja um bilhão de casos, dos quais de três a cinco milhões são casos graves, resultando em centenas de milhares de

mortes relacionadas à influenza (IULIANO *et al.*, 2018; TAUBENBERGER *et al.*, 2019; FLERLAGE *et al.*, 2021; UNWIN *et al.*, 2021).

De fato, no final de 2021 a situação tornou-se ainda mais preocupante diante do aparecimento dos surtos com a nova cepa do subtipo A (H3N2), durante a pandemia da SARS-CoV-2. Possivelmente, o fator contribuinte para o cenário de transmissão rápida foi a baixa cobertura vacinal nos últimos dois anos no país, com 71,2% do grupo alvo vacinado em 2021 e 82% em 2020 (RODRIGUES, 2007; CNN BRASIL, 2021; FUJITA *et al.*, 2022).

Além das epidemias sazonais, a introdução de InfA de populações aviárias ou suínas levou a quatro pandemias descritas na Figura 7 (1918 H1N1 - Espanhola, 1957 H2N2 - Asiática, 1968 H3N2 – de Hong Kong e 2009 H1N1 - Mexicana), com a mais grave ocorrendo em 1918 (gripe espanhola) (WEBSTER *et al.*, 2014; FLERLAGE *et al.*, 2021; KRAMMER *et al.*, 2018). As pandemias de InfA são normalmente iniciadas pela introdução de um vírus com um novo subtipo HA que é geneticamente muito diferente das cepas circundantes anteriormente e, por isso, a falta de imunidade entre os humanos (LOBO, 2015; KRAMMER *et al.*, 2018).

Figura 7. Uma breve linha do tempo das pandemias. Uma breve linha do tempo das principais principais pandemias causadas pelo Influenza A.



Fonte: Autor

O principal reservatório de diversas cepas e subtipos de InfA são aves silvestres, especialmente patos e gansos migratórios, sendo que a transmissão entre eles pode ocorrer diretamente da água contaminada (KRAMMER *et al.*, 2018). Embora a maioria dos subtipos de InfA causem infecções assintomáticas em espécies aviárias, mutações adaptativas podem levar a uma série de mudanças que incluem variações na antigenicidade, aumento da diversidade em sequências de proteínas virais, preferência por receptor, virulência e evasão da resposta imune,

contaminando, assim, os humanos (KRAMMER *et al.*, 2018; ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Em algum momento no passado distante o InfB divergiu do InfA (SANDT *et al.*, 2015). Atualmente, duas linhagens são distinguidas com base em sua glicoproteína HA: a linhagem B/Victoria (nomeada após a cepa B/Victoria/ 2/1987) e a linhagem B/Yamagata (nomeada após a linhagem B/Yamagata/16 cepa /1988) e ambas essas linhagens co-circulam com os vírus sazonais A/H2N3 e A/H1N1 (SANDT *et al.*, 2015).

1.3. Sintomatologia e formas de transmissão dos vírus influenza e SARS-CoV-2

O início de uma pandemia requer o surgimento de um vírus capaz de persistir através da transmissão de humano para humano em uma população na qual há pouca ou nenhuma imunidade pré-existente (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). A capacidade dos vírus influenza A se adaptarem a vários hospedeiros e sofrerem eventos de rearranjo garante o surgimento de novas cepas e consequentemente, surtos sazonais todos os anos (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Os surtos sazonais do vírus da gripe geralmente ocorrem nos meses de inverno, quando a baixa umidade e as baixas temperaturas favorecem a transmissão (KRAMMER *et al.*, 2018.) No entanto, ao contrário das regiões temperadas, os padrões sazonais da gripe são muito diversos nos países tropicais (KRAMMER *et al.*, 2018). Os fatores climáticos, incluindo temperatura mínima, horas de sol e precipitação máxima, parecem ser os responsáveis pela sazonalidade da gripe (KRAMMER *et al.*, 2018). Os InfB sazonal circulam em humanos com o InfA e seguem os mesmos padrões de transmissão (KRAMMER *et al.*, 2018). A transmissão do vírus influenza pode ocorrer por diferentes vias: gotículas liberadas através de espirros e tosse de indivíduos infectados que entram em contato com membranas das mucosas; inalação de partículas infecciosas suspensas no ar; e contaminação das mãos e posterior contato com as mucosas (LOBO, 2015). O tamanho da partícula, a distância de propagação, a disposição, a temperatura e a umidade relativa são consideradas fatores que influenciam a taxa de transmissibilidade do vírus influenza (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Superfícies contaminadas também desempenham um papel essencial na transmissão, já que um patógeno respiratório pode sobreviver nessas superfícies, sem ser transferido para as mãos ou outros equipamentos (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Estudos mostram que o InfA sobreviveu por 24 a 48 horas em superfícies de aço inoxidável e plástico (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

Observou-se que cargas quantificáveis de InfA eram transmitidas de superfícies de aço inoxidável para mãos após 24h e dos tecidos para as mãos por até 15 min. Os vírus também sobrevivem nas mãos por até 5 minutos após a transferência de superfícies (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Esses resultados indicam uma alta taxa de transmissão para o InfA (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

A infecção humana com o vírus influenza produz um amplo espectro de gravidade clínica, que varia de infecção assintomática até a morte (FLERLAGE *et al.*, 2021). Em indivíduos que se tornam infectados, interações complexas entre fatores virais e do hospedeiro influenciam o local de replicação e a resposta imune correspondente, que determinam a gravidade da doença (FLERLAGE *et al.*, 2021). A influenza tem duração aproximadamente de uma semana e afeta principalmente as vias aéreas superiores e ocasionalmente, as inferiores (LOBO, 2015). O paciente pode apresentar sintomas como febre alta, dores musculares, dor de cabeça, mal-estar, tosse não produtiva, coriza e rinite (LOBO, 2015). Crianças pequenas sem exposição prévia e imunologicamente ingênuas ao vírus estão em risco de doença grave (FLERLAGE *et al.*, 2021). A infecção por influenza ocorre em pessoas de qualquer faixa etária, embora os riscos de complicações graves, internação hospitalar e morte sejam maiores entre pessoas com mais de 65 anos (JAVANIAN *et al.*, 2021). As complicações da influenza durante a gravidez, como pneumonia, podem estar associadas a taxas de mortalidade (JAVANIAN *et al.*, 2021). A eficácia da memória adaptativa na prevenção da infecção pode ser específica de um subtipo e há evidências que sugerem que a primeira exposição ao antígeno do vírus influenza pode influenciar a qualidade da memória imune adquirida ao longo da vida (FLERLAGE *et al.*, 2021).

Por outro lado, o SARS-CoV-2, apesar de apresentar similaridade ao vírus influenza quanto ao modo de transmissão e sintomatologia difere quanto ao grau de gravidade da doença, taxonomia, genômica e estrutura (FLERLAGE *et al.*, 2021). Desde o reconhecimento da doença, uma ampla gama de gravidade da doença foi descrita, desde infecção assintomática a doença grave e morte (FLERLAGE *et al.*, 2021). A transmissão do SARS-CoV-2 pode ocorrer por: partículas expelidas por tosse, espirro, respiração ou fala; inalação de partículas infecciosas suspensas no ar; e contato com superfícies contaminadas (SHARMA *et al.*, 2021). Já os sintomas mais frequentes identificados da COVID-19 é tosse, seguida de febre, mialgia,

dispnéia e cefaléia, embora, dor de garganta, diarreia, náuseas e perda de olfato também sejam relatadas (FLERLAGE *et al.*, 2021). Distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes e doença renal juntamente com a idade e condições cardiovasculares (hipertensão, doença cardíaca e doença arterial coronariana) foram associados ao aumento da gravidade da doença (FLERLAGE *et al.*, 2021). Além disso, enquanto, no vírus influenza as crianças são o principal grupo de portadores do vírus da gripe, no COVID-19, as crianças são menos afetadas do que os adultos e as idades mais avançadas com condições subjacentes e estão associadas a sintomas graves da doença (PORMOHAMMAD *et al.*, 2020).

Como os InfA, os fatores que afetam a sobrevivência desses vírus em superfícies incluem a variação da cepa, título, tipo de superfície, modo de deposição, temperatura, umidade e a viabilidade do vírus (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Desde o início da pandemia de SARS-CoV-2, vários pesquisadores tentaram analisar o tempo de sobrevivência desse vírus em diferentes superfícies (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Um estudo publicado em meados de março de 2020 analisou as estabilidades de aerossol e superfície desse vírus (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). Na metodologia utilizou-se cinco ambientes diferentes (aerossóis, plástico, aço inoxidável, cobre e papelão) e os resultados mostraram que a meias-vida do SARS-CoV-2 e foi semelhante em aerossóis e em cobre (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020). No entanto, os níveis mais altos de viabilidade para o vírus foram observados em aço inoxidável e plástico (~5,6 h em aço inoxidável e 6,8 h em plástico) (ABDELRAHMAN *et al.*, 2020).

O potencial impacto da COVID-19 juntamente com o influenza na morbidade, mortalidade e capacidade dos serviços de saúde é uma grande preocupação, já que a coinfeção pode levar a resultados mais graves das doenças (STOWE *et al.*, 2021). Desde o início da pandemia de SARS-CoV-2 em 2020, foram publicados vários relatos de casos de coinfeção por SARS-CoV-2 e influenza com desfechos graves (STOWE *et al.*, 2021).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Os vírus influenza provocam infecções no sistema respiratório que podem levar a complicações mais graves, como a pneumonia (NASIR *et al.*, 2021). Desde o começo do século XX esses vírus já causaram quatro pandemias, e todo ano são

causadores de epidemias sazonais. Uma vez que todas as suas gerações (A-D) podem sofrer mutações, ou rearranjos com muita frequência, há a possibilidade do surgimento de novas cepas virais, o que provoca atualizações nas medidas preventivas e o fortalecimento das campanhas de vacinação (OU *et al.*, 2009; TAUBENBERGER *et al.*, 2019; PORMOHAMMAD *et al.*, 2020; NASIR *et al.*, 2021).

Nota-se que sucessivas epidemias dos séculos passados foram responsáveis pela diminuição da mortalidade, refletidas pela melhora no cuidado dos pacientes, melhora nas condições sanitárias e implantação de medidas preventivas (MAYURAMART *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). No entanto, apesar da vigilância do vírus, permanecem os riscos de expansão e disseminação da influenza (MAYURAMART *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). Dessa maneira, análises e estudos que visem a evolução e o impacto desse agente infeccioso na sociedade ainda são necessários (MAYURAMART *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). Também se soma a necessidade constante do emprego de métodos acurados de diagnóstico por contribuir no tratamento médico e interrupção eficaz dos surtos nas comunidades (MAYURAMART *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

Em geral os sintomas da gripe são febre alta, dor de garganta, cefaléia, tosse e dificuldade de respirar (CHEN *et al.*, 2022). Este quadro clínico é similar a COVID-19, com casos graves se manifestando como SRAG dentro de uma semana após a infecção. Portanto, dado a clínica semelhante entre a COVID-19 e a influenza, o método de detecção diferencial é fundamental para se determinar qual o tipo de infecção, contribuindo assim para a elucidação de qual o peso do agente patogênico associado a um determinado surto na população local (OU *et al.*, 2009; PORMOHAMMAD *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

Existem grandes lacunas de conhecimento a respeito da infecção por outros patógenos respiratórios nos pacientes negativos para a COVID-19. Um dos poucos estudos abordando essa temática tem verificado 1.100.000 casos de síndrome gripal entre os meses de março a junho de 2020 nos profissionais de saúde do Brasil (ASSUNÇÃO *et al.*, 2021). Entretanto, o número de casos confirmados de COVID-19 foi de 900 mil na população do estudo, indicando, possivelmente, a circulação de outros patógenos respiratórios no grupo dos profissionais da saúde (WORLDOMETER, 2022). Outros estudos, encontraram taxa de positividade dos InfA e InfB, variando de 8% a 23,5% nos pacientes que foram negativos para o

SARS-CoV-2 nos Estados Unidos e Israel (SCHIRMER *et al.*, 2021; KRIGER *et al.*, 2022). Essas informações claramente mostram a relevância do monitoramento destes vírus, a fim de conhecer o seu peso epidemiológico na pandemia da COVID-19 (SCHIRMER *et al.*, 2021; KRIGER *et al.*, 2022).

Ainda que a pandemia da COVID-19 seja um impasse para os sistemas de saúde e para a população, diversos fatores podem exacerbar a gravidade do quadro dos pacientes, entre os quais está o inverno, onde predomina a incidência gripal e favorece a coinfeção entre o SARS-CoV-2 e o vírus influenza (CASTRO *et al.*, 2022). A prevalência e os resultados para pacientes com COVID-19 com coinfeções ainda não são bem descritos, um dos estudos realizados na China apresentou que dentre os 75 pacientes diagnosticados com pneumonia por COVID-19, 30,7% dos pacientes encontravam-se também infectados com InfA, InfB ou vírus parainfluenza (LIU *et al.*, 2021; SCHIRMER *et al.*, 2021).

Em decorrência da problemática apresentada, esta pesquisa tem como propósito detectar os InfA e InfB em amostras negativas e positivas para SARS-CoV-2, São José do Rio Preto–SP, durante a primeira onda epidêmica da COVID-19. Os casos que se mostram negativos para o SARS-CoV-2 podem revelar a prevalência e a disseminação de outros vírus respiratórios. Ademais, as coinfeções de SARS-CoV-2 e outros patógenos virais respiratórios, como os vírus influenza, podem impor desafios adicionais aos sistemas de saúde ambulatorial e hospitalar (KRIGER, *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a positividade dos InfA e InfB em amostras nasofaríngeas de indivíduos profissionais da saúde, e seus contactantes, com suspeita de infecção pelo SARS-CoV-2.

3.2. Objetivos Específicos

Detectar o material genético dos InfA e InfB, em amostras nasofaríngeas de indivíduos de São José do Rio Preto-SP, com suspeita clínica de COVID-19, oriundos da primeira onda pandêmica;

Descrever as frequências de positividade de infecção viral em amostras biológicas negativas e positivas para o SARS-CoV-2;

Verificar se a positividade viral dos InfA e InfB estão associadas com variáveis demográficas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

As amostras biológicas que entraram na triagem laboratorial foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (protocolo n. 33202820.7.1001.5348). Portanto, amostras de swab da nasofaringe foram coletadas durante o período de junho e novembro do ano de 2020. Estas amostras, representativas de profissionais da saúde e seus contactantes que apresentaram sintomas, foram coletadas por equipes da área da saúde do município de São José do Rio Preto e encaminhadas ao Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) da UNESP, instituição localizada no município supracitado. Após o recebimento do material biológico o mesmo foi triado para o diagnóstico molecular do SARS-CoV-2, com o restante do volume aliquotado e adequadamente armazenadas no freezer -80°C.

4.2. Local de Estudo, Infraestrutura, Equipamentos e Recursos Financeiros

O projeto de pesquisa foi realizado no LEGO da UNESP. O laboratório possui infraestrutura adequada para a realização do estudo, tendo sido destaque na linha de frente do enfrentamento à pandemia de COVID-19 (<https://jornal.unesp.br/2022/01/13/>). O local da pesquisa possui salas individualizadas para realização de extração do RNA viral, sala de preparação de mix de PCR e sala para condução da PCR em tempo real. Adicionalmente, o laboratório possui recursos humanos com vasta experiência em pesquisa na área de Virologia.

No tocante a equipamentos, resumidamente o local possui cabines de segurança biológica, freezer -80°C, extrator semi-automatizado de DNA/RNA (Unixtractor), termocicladores (Amplitem Applied Biosistem), sequenciador de DNA do tipo Sanger, Bio-Rad CFX 96, entre outros.

Por fim, salienta-se que o presente estudo está inserido na rede Corona-Ômica.BR/MCTI/FINEP (Rede Nacional de genomas, exoma e transcriptoma de COVID-19 para identificação de fatores associados à dispersão da epidemia e severidade), possuindo recursos financeiros (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4).

4.3. Extração do RNA

A extração do RNA aconteceu por meio do método de Beads magnéticas. As soluções usadas foram distribuídas de acordo com a Tabela 1. A solução de lise presente nessa Tabela foi preparada de acordo com a Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição das soluções de extração de RNA nas placas do robô de extração

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sol. de Lise (Tampão GITC + Isopropanol + beads + PK) (400 µL)	Isopropanol (150 µL)	Etanol 70% (200 µL)	Etanol 70% (200 µL)	DEIXAR VAZIA	Tampão de Eluição (100 µL)	Sol. de Lise (Tampão GITC + Isopropanol + beads + PK) (400 µL)	Isopropanol (150 µL)	Etanol 70% (200 µL)	Etanol 70% (200 µL)	DEIXAR VAZIA	Tampão de Eluição (100 µL)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabela 2. Quantidade de reagentes necessários para a solução de lise durante a extração de RNA

Reagente	µL/poço	1 placa (c/ 10% a mais)	6 placas (c/10% a mais)
GITC	100 µL	1,8 mL	10,8 mL
Isopropanol	270 µL	4,8 mL	28,8 mL
Beads	20 µL	360 µL	2,2 mL
Total		390 µL	

Após distribuir as seguintes soluções nas placas do robô de extração:

1. Dispensar 200 µL de amostra nos poços das colunas 1 e 7;
2. Inserir a placa e os tip combs no robô de extração e correr o ciclo Covid-19, conforme explicado no protocolo de extração – Programação do UniXtractor presente na tabela 3;
3. Ao final do ciclo, apoiar as placas nas racks magnéticas e retirar 90 µL do material;

4. Purificado nas colunas 6 e 12.
5. Seguir para a etapa da PCR em tempo real ou armazenar em -70°C.

Protocolo de extração – Programação do UniXtractor

1. Entrar no modo de edição de protocolos;
2. Programar o ciclo do robô de extração UniXtractor de acordo com os seguintes

parâmetros:

Tabela 3. Ciclo do robô de extração UniXtractor

Etapa	Col	Nome	Espera (0-30 min)	Mix (0-30 min)	Volume (100-10 00 µL)	Veloc. Mix(1- 3)	Mag (0-120 seg)	Temp (40-80 °C)
	1	BIND	0	1	600	1	120	0
	2	WASH 1	0	1	150	2	120	0
	3	WASH 2	0	1	200	2	120	0
	4	WASH 3	0	1	200	2	120	0
	6	ELUTE	3	3	100	3	120	0
	4	WASTE	0	1	200	3	0	0
	3	WASTE 2	0	1	200	3	0	0

4.4. PCR em tempo real duplex

Para o ensaio duplex em um único tubo, sondas foram marcadas com corantes 6-carboxi-X-rodamina (ROX) e tetramethylindo(di)-carbocyanines-5 (Cy5), além da utilização de primers específicos (Tabela 4).

Tabela 4. Ensaio duplex contendo os primers e sondas dos InfA/B.

Nome	Descrição	Sequência oligonucleotídica (5'>3')	Concentração
InfA-F	InfA For1	CAA GAC CAA TCY TGT CAC CTC TGA C	3.33 µM
	InfA For2	CAA GAC CAA TYC TGT CAC CTY TGA C	3.33 µM
InfA-R	InfA Rev1	GCA TTY TGG ACA AAV CGT CTA CG	5.00 µM
	InfA Rev2	GCA TTT TGG ATA AAG CGT CTA CG	1.67 µM
InfB-F	InfB For	TCC TCA AYT CAC TCT TCG AGC G	6.67 µM
InfB-R	InfB Rev	CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG	6.67 µM
InfA-P	InfA Probe1	Cy5/TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG/BHQ-3'	1.67 µM
InfB-P	InfB Probe2	ROX/CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG/BHQ-2	1.67 µM

Os primers e sondas para a detecção do InfA foram selecionados de uma região conservada do gene da matriz (M1). Os iniciadores e a sonda selecionados para detecção do InfB foram selecionados de uma região conservada do gene 2 não estrutural (NS2).

Brevemente, o ensaio do duplex PCR em tempo real consistiu do preparo da solução estoque a partir dos primers e sondas liofilizados. Dessa forma, foi adicionado TE 1X na quantidade necessária para diluir os primers (InfA/B) a 500 μ M e 100 μ M, enquanto as sondas (Influenza A e B) foram diluídas somente a 100 μ M. A solução de uso conteve 20 μ M de cada primer e a sonda com 10 μ M, ambos diluídos em água livre de nucleases.

A triagem molecular foi realizada utilizando um kit One-Step Probe RT-qPCR (Merck, St. Louis, USA) em um sistema de PCR em tempo real rápido modelo Bio-Rad CFX 96 com 10 μ l volume de reação contendo 0,75 μ l de mix primers/sonda de reação com 7,5 μ l de KicqStar (mix de enzima DNA taq polimerase, transcriptase reversa, DNTps, tampões), acrescido de 1,75 μ l de água livre de nuclease. Individualmente, esse mix recebeu 5 μ l de RNA extraído. Em relação aos controles, os plasmídeos contendo insertos dos influenzas foram utilizados como controles positivos, enquanto os controles negativos continham água livre de nuclease com o template. Utilizou-se o seguinte protocolo de ciclo térmico: 50°C por 10 min (transcrição reversa), 95°C por 2 min (inativação da enzima transcriptase reversa) e 45 ciclos de 95°C por 5 s (desnaturação) e 60°C por 30 s (anelamento e aquisição do sinal) (CDC Influenza, 2021a; CDC Influenza, 2021b).

Os dados obtidos pelo RT-PCR em tempo real (Bio-Rad CFX 96) foram analisados por sondas e primers específicos voltados à detecção e quantificação dos InfA/B. Para tanto, a análise envolveu medida do ciclo de quantificação (Cq) de fluorescência. Consequentemente, os parâmetros analisados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Medida do ciclo de quantificação do sinal de fluorescência no PCR em tempo real

Valor de Cq	Resultado
Cq < 40	Positivo
Cq $\geq$ 40	Negativo
Cq $\geq$ 40 (InfA e InfB)	Inconclusivo
Cq $\geq$ 35 (RNase P)	

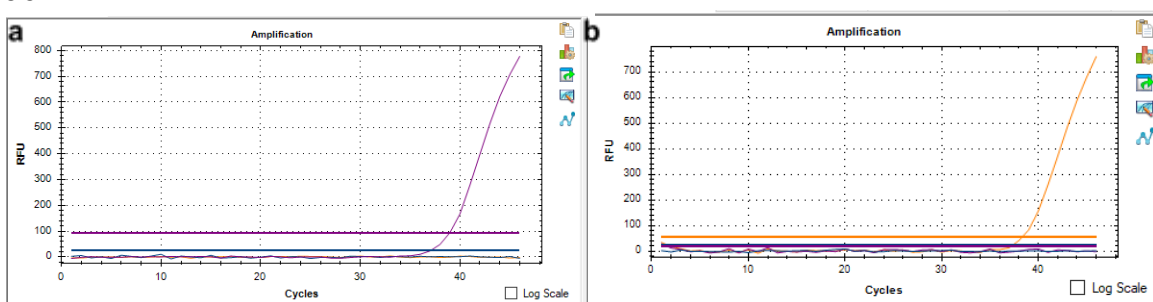
4.5. Análise Estatística

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar o status de positividade para os InfA/B de acordo com as variáveis disponíveis (mês de coleta, sexo, idade) a um nível de significância de 0,01. Razões de chances (*odds ratio*) correspondentes a intervalos de confiança de 95% também foram calculadas para proporções. Utilizou-se o software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, USA) para fazer a análise estatística.

5. RESULTADOS

Entre maio e setembro de 2020, um total de 901 amostras nasofaríngeas constituíram o nosso *n* amostral. Das quais, 733 (81,4%) e 168 (18,6%) foram negativas e positivas, respectivamente, para o SARS-CoV-2. Os resultados por RT-PCR em tempo real revelaram que entre as amostras negativas houve positividade de 1.9% (14/733) para o InfA, enquanto 0.13% (1/733) foram positivas para o InfB. Dados de coinfeção, que ocorreram somente entre o InfA e SARS-CoV-2, foram observados em 1.8% (3/168) das amostras. Resultados dados como positivos, pelo equipamento Bio-Rad CFX 96, estão apresentados na Figura 8, o qual revela o sinal de fluorescência, associado a síntese de um amplicon, que em determinado ciclo ultrapassa o *threshold*.

Figura 8. Curva de monitoramento do sinal de fluorescência no PCR em tempo real. Ilustram a amplificação em tempo real para uma amostra positiva para o InfA (a). Curva de monitoramento de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo real para uma amostra positiva para o InfB (b). Imagem capturada do equipamento Bio-Rad CFX 96.



As tabelas apresentam uma descrição geral das três variáveis analisadas: sexo, idade e mês de coleta. Os resultados da Tabela 6 demonstram que os dados utilizados em cruzamentos com as frequências demográficas das referidas amostras para o cálculo do teste de Qui-quadrado, revelaram que somente houve associação negativa entre a faixa etária de 10-19 anos com o SARS-CoV-2 ($p > 0.01$). Todavia,

apesar de não haver significância estatística quanto a positividade viral associada a maioria dos grupos, a incidência da COVID-19 teve maior frequência em específicos grupos, incluindo os indivíduos do sexo feminino (53,33%), idade de 20 a 29 anos (24,4%) e entre o mês de coleta de maio (79,7%).

Por outro lado, a Tabela 7 representa os casos de infecção por influenza A e B e sua associação com as mesmas variáveis analisadas na Tabela 6: sexo, idade e o mês de coleta. Nela estão descritos que dentre todas as amostras analisadas 1,9% (18/901) foram positivas para os vírus influenza. Para o grupo SARS-CoV-2 negativo, 1,9% (14/733) e 0,13% (1/733) foram positivas para os InfA e InfB, respectivamente. A análise do teste Qui-quadrado quanto a esses resultados mostraram associação positiva entre o InfA e o mês de coleta de julho ($p < 0.01$).

Por fim, a Tabela 8 representa os casos de coinfeção entre os InfA/B e SARS-CoV-2. Os resultados obtidos mostraram coinfeção entre os InfA e SARS-CoV-2 (3/168), porém não houve coinfeção entre o InfB e SARS-CoV-2.

Tabela 6. Análise da incidência da COVID-19 entre os grupos: sexo, idade e mês de triagem das amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19.

Variável	Total amostras	COVID-19	Sem-COVID-19	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
n (%)	901 (100)	168 (18.65)	733 (81.33)	
Sexo				
Homem	380 (42,32)	77 (46.67)	303 (41.33)	0.2
Mulher	518 (57.68)	88 (53.33)	430 (58.67)	
Idade (anos)				
0-4	53 (5.9)	8 (4.96)	45 (6.29)	0.5
5-9	6 (0.8)	1 (0.62)	5 (0.84)	0.77
10-19	53 (6.7)	2 (1.2)	51 (8.1)	0.001
20-29	174 (22.45)	41 (24.4)	133 (21.9)	0.4
30-39	206 (26.5)	40 (23.8)	166 (27.3)	0.35
40-49	178 (22.9)	39 (23.2)	139 (22.8)	0.93
50-59	104 (13.8)	20 (12.4)	84 (14.2)	0.54
60-69	26 (34.6)	9 (5.5)	17 (2.8)	0.09
70-79	19 (2.1)	0 (0.0)	19 (2.6)	0.03
80+	7 (0.7)	1 (0.6)	6 (0.8)	0.7
Triagem (mês)				
Mai/2020	697 (77.4)	134 (79.7)	563 (76.9)	0.4
Jun/2020	34 (3.7)	1 (0.5)	33 (4.5)	0.01
Jul/2020	44 (4.8)	7 (4.1)	37 (5)	0.6
Ago/2020	118 (13.1)	25 (14.8)	93 (12.7)	0.45
Set/2020	7 (0.7)	1 (0.5)	6 (0.8)	0.76

Tabela 7. Análise da incidência de influenza A/B entre os grupos: sexo, idade e mês de triagem das amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19

Variável	Total amostras	InfA/InfB	Sem-InfA/InfB	p
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
n (%)	901 (100)	18 (1.9)	883 (98)	
Sexo				
Homem	380 (42,32)	4 (22)	376 (42.5)	0.11
Mulher	518 (57.68)	13 (72)	505 (57.1)	
Idade (anos)				
0-4	53 (5.9)	1 (5.5)	52 (5.8)	0.99
5-9	6 (0.8)	0 (0.0)	6 (0.6)	0.73
10-19	53 (6.7)	2 (11.1)	51 (5.7)	0.29
20-29	174 (22.45)	6 (33)	168 (19)	0.09
30-39	206 (26.5)	3 (16.6)	203 (22.9)	0.62
40-49	178 (22.9)	5 (27.7)	173 (19.5)	0.23
50-59	104 (13.8)	0 (0.0)	104 (11.7)	0.13
60-69	26 (34.6)	0 (0.0)	26 (2.9)	0.47
70-79	19 (2.1)	0 (0.0)	19 (2.1)	0.54
80+	7 (0.7)	0 (0.0)	7 (0.7)	0.71
Triagem (mês)				
Mai/2020	697 (77.4)	12 (66%)	685 (77.5)	0.27
Jun/2020	34 (3.7)	1 (5.5%)	33 (3.7)	0.68
Jul/2020	44 (4.8)	4 (22%)	40 (4.5)	<0.001
Ago/2020	118 (13.1)	1 (5.5%)	117 (13.2)	0.33
Set/2020	7 (0.7)	0 (0.0%)	7 (0.7)	0.7

Tabela 8. Análise da incidência de coinfeção entre os InfA/B e SARS-CoV-2 entre as amostras coletadas no município de São José do Rio Preto – SP, representativas da primeira onda epidêmica da COVID-19

Identificação	Sexo	Idade	Coleta	Ct(qPCR)	Influenza	SARS-CoV-2
P0030	Feminino	30	05/05/2020	38,9	Influenza A	NEGATIVO
P0037	Feminino	45	05/05/2020	39	Influenza A	NEGATIVO
P0103	-	43	07/05/2020	37,8	Influenza A	POSITIVO
P0110	Masculino	49	07/05/2020	39	Influenza B	NEGATIVO
P0131	Masculino	26	07/05/2020	39,5	Influenza A	POSITIVO
P0155	Feminino	28	11/05/2020	39,7	Influenza A	POSITIVO
P0159	Masculino	26	11/05/2020	39	Influenza A	NEGATIVO
P0171	Feminino	16	11/05/2020	39	Influenza A	NEGATIVO
P0415	Masculino	24	19/05/2020	39,4	Influenza A	NEGATIVO
P0422	Feminino	44	19/05/2020	39,6	Influenza A	NEGATIVO
P0567	Feminino	27	26/05/2020	38,7	Influenza A	NEGATIVO
P0644	Feminino	4	27/05/2020	39,7	Influenza A	NEGATIVO
P0738	Feminino	49	17/06/2020	39,8	Influenza A	NEGATIVO
P0748	Feminino	25	22/07/2020	39,8	Influenza A	NEGATIVO
P0749	Feminino	18	22/07/2020	39,7	Influenza A	NEGATIVO
P0762	Feminino	35	28/07/2020	38	Influenza A	NEGATIVO
P0766	Feminino	29	28/07/2020	38	Influenza A	NEGATIVO
P0899	Feminino	35	21/08/2020	39	Influenza A	NEGATIVO

6. DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou diferenças quantitativas entre pacientes monoinfectados por SARS-Cov-2 e pacientes coinfectados com InfA/B. A baixa quantidade de amostras positivas para coinfecção com o vírus influenza tem relação com o começo de uma pandemia acompanhada pelo uso de máscaras, desinfecção de superfícies e distanciamento social. A associação entre medidas preventivas e a baixa disseminação de vírus respiratórios, como influenza, são descritas no estudo de Sakamoto *et al.* (2020), os quais analisaram dados epidemiológicos de 2014 a 2020 e mostraram que os números de casos de influenza sazonal em 2020 são menores do que em anos anteriores no Japão. Outros como o de Eldesouki *et al.* (2022), ainda, revelam que através de testes laboratoriais realizados em amostras nasais/nasofaríngeas coletadas no laboratório Johns Hopkins Medical Microbiology, que logo após o relaxamento das medidas de controle de infecção no final da primavera de 2021, a circulação de vírus respiratórios, incluindo principalmente vírus sincicial respiratório (RSV) e enterovírus/rinovírus, apresentou um aumento acentuado.

A inclusão neste estudo de profissionais da saúde pode ter contribuído para a baixa taxa de positividade dos vírus influenza, pois profissionais da saúde constituem grupo prioritário para a vacinação e a cobertura vacinal tende a ser maior neste grupo (HAMMER *et al.*, 2021). Esse contexto de menor incidência do vírus influenza neste grupo em específico foi observado por Kliner *et al.* (2016) e colaboradores. Para este estudo, conduzido no Reino Unido, sugere-se que a cada 10% de aumento da cobertura vacinal pode estar associado a diminuição de 10% da influenza. Logo, esta informação mostra que a prevalência do vírus influenza aqui descrita pode ter sido menor por envolver um grupo prioritário de vacinação menos propenso a infecção pelos vírus influenza.

De fato, em dezembro de 2019 o surto de SARS-CoV-2 coincidiu com a epidemia viral de InfA, e, embora existam muitos estudos de casos que documentam a presença de coinfecções por SARS-CoV-2, existem relativamente poucos estudos que pesquisam outros vírus respiratórios associados às amostras de indivíduos negativos para a COVID-19 (KIM *et al.*, 2022; DADASHI *et al.*, 2021; SWETS *et al.*, 2022). Nesse contexto, Schirmer e seus colaboradores (2021), por exemplo, testaram indivíduos em unidades de saúde VHA para pacientes internados ou

ambulatoriais de 50 estados, bem como do Distrito de Columbia e Porto Rico a partir de 29 de setembro de 2019 até 31 de maio de 2020 separando-os em três grupos: (1) indivíduos coinfectados com COVID-19 definidos como aqueles que testaram positivo para SARS CoV-2 e em pelo menos um outro patógeno respiratório por meio de teste molecular ou cultura viral; (2) indivíduos monoinfectados com COVID-19 definidos como aqueles que testaram positivo para SARS-CoV-2 e testaram negativo para outros patógenos respiratórios; e (3) indivíduos infectados por patógeno respiratório, mas tiveram resultado negativo para SARS-CoV-2. Dentre os 227.109 testes SARS-CoV-2 realizados (174.746 indivíduos), houve 6,5% testes positivos (10.222 indivíduos), visto que 3.757 indivíduos que testaram positivo para SARS-CoV-2 e foram testados para pelo menos um outro patógeno respiratório, a coinfeção por COVID-19 foi encontrada em 1,5% indivíduos, enquanto 98,5% eram COVID-19 monoinfectados (Schirmer *et al.*, 2021). Dos 1,5% com coinfeção por COVID-19, 15 eram de influenza (12 influenza A e 3 influenza B) (Schirmer *et al.*, 2021). Já entre os 26.306 indivíduos negativos para SARS-CoV-2 e testados para outros patógenos respiratórios, 3,9% foram positivos para pelo menos um patógeno respiratório não SARS-CoV-2 (Schirmer *et al.*, 2021). Comparativamente ao estudo de Schirmer *et al.* (2021), a nossa pesquisa mostra similaridade aos seus resultados, embora apresente um n amostral menor.

Apesar da presente pesquisa, e outros trabalhos, apresentarem baixa incidência de influenza no período analisado, houve um aumento significativo dos casos de influenza em todos os estados brasileiros em 2021 (BUTANTAN, 2022). Surtos de influenza no Brasil possuem um padrão sazonal onde a maioria dos casos acontecem no outono ou inverno, porém o cenário no qual nos deparamos é completamente diferente já que vários casos surgiram no final da primavera e no início da temporada do verão (FUJITA *et al.*, 2022). Continuamente a isso, a secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, informou, no dia 11 de Janeiro, que os testes realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels (Lacen) apresentaram uma taxa de positividade de 60% para InfA, enquanto a de COVID-19 estava em 2% (CNN BRASIL, 2021). Em São Paulo, em novembro de 2021, a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) também registrou um total de 111.949 atendimentos de pessoas com sintomas gripais, sendo 56.220 suspeitos de COVID-19. Já na primeira quinzena de dezembro do mesmo ano, a SMS registrou

um total de 91.882 atendimentos com quadro respiratório, sendo 45.325 suspeitos de COVID-19 (CNN BRASIL, 2021).

Um dos motivos que provavelmente contribuíram para a rápida transmissão do vírus influenza foi a flexibilização das medidas preventivas não farmacológicas devido ao longo período de restrições e altas taxas de vacinações, que apesar de serem altas para o SARS-CoV-2 foram baixas para o vírus influenza (BUTANTAN, 2022; FUJITA *et al.*, 2022). Segundo o Ministério da Saúde, em 2021 foram aplicadas cerca de 67,9 milhões de doses da vacina contra a gripe em todo o país (CNN BRASIL, 2021; FUJITA *et al.*, 2022). Esse quantitativo representa uma cobertura vacinal de 71,2%, considerando o público-alvo da campanha (CNN BRASIL, 2021; FUJITA *et al.*, 2022). Em 2020, a cobertura vacinal no país foi de 82% (55,7 milhões de pessoas), enquanto em 2019 chegou a 91% (54,4 milhões de pessoas) (CNN BRASIL, 2021; FUJITA *et al.*, 2022). Em suma, devido a menor cobertura vacinal contra a gripe no período de 2021, possivelmente a inclusão de amostras deste ano em nosso estudo tenderia a aumentar a positividade dos casos de influenza.

Em relação a significância estatística quanto a positividade viral associada às variáveis analisadas, é possível observar similaridades e dessemelhança com o estudo de Schirmer *et al* (2021), visto que em seu estudo, os indivíduos coinfectados com SARS-CoV-2 foram proporcionalmente semelhantes aos indivíduos monoinfectados com SARS-CoV-2, mas proporcionalmente diferentes dos indivíduos infectados por patógenos respiratórios não SARS-CoV-2. Já quando comparados com pacientes monoinfectados por COVID-19, os pacientes coinfectados por COVID-19 eram menos propensos a serem do sexo feminino e não havia diferenças entre as faixas etárias (Schirmer *et al.*, 2021). Analisando outros estudos os resultados acerca das variáveis analisadas não possuem um consenso, pois há estudos nos quais aqueles com coinfecção por COVID-19 eram mais jovens, enquanto para outro estudo não foi observado diferença de idade entre os pacientes coinfectados por COVID-19 e monoinfectados por COVID-19 (HAZRA *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020).

Apesar disso, é possível que fatores do hospedeiro, incluindo idade, sexo e condições mórbidas, sejam determinantes chave da gravidade e progressão da

COVID-19 (ZHOU *et al.*, 2020). Nas epidemias de COVID-19, os pesquisadores encontraram que as comorbidades, incluindo hipertensão, diabetes e doenças coronarianas estavam presentes em quase metade dos pacientes internados com COVID-19 (ZHOU *et al.*, 2020). Ademais, Chen *et al.* (2021) e colaboradores estimaram que o declínio relacionado à idade e a desregulação da função imunológica, ou seja, imunossenescência e inflamação desempenham um papel importante na contribuição para o aumento da vulnerabilidade a resultados graves de COVID-19 em adultos mais velhos.

7. CONCLUSÃO

Em síntese, os dados gerados mostraram positividade de 1.9% (14/733) para o InfA, enquanto para o InfB houve positividade de 0.13% (1/733) entre o grupo de amostras negativas para o SARS-CoV-2. Quanto às amostras SARS-CoV-2 positivas, a coinfeção ocorreu apenas entre o InfA (1.7%, 3/168). Para análise de potenciais variáveis associadas com a positividade viral, observou-se associação negativa entre a faixa etária de 10-19 anos com o SARS-CoV-2, e associação positiva entre a positividade pelo InfA com o mês de julho. A partir dos resultados gerados espera-se contribuir na determinação do perfil de positividade dos vírus influenza entre as amostras clínicas suspeitas de infecção pelo SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, Zeinab; LI, Mengyuan; WANG, Xiaosheng. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. **Frontiers In Immunology**, v. 11, p. 1-10, 11 set. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.552909>.
- AKHTAR, Zubair *et al.* SARS-CoV-2 and influenza virus coinfection among patients with severe acute respiratory infection during the first wave of COVID-19 pandemic in Bangladesh: a hospital-based descriptive study. **Bmj Open**, v. 11, nov. 2021. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2021-053768>.
- ANDERSEN, Kristian G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, p. 450-452, 17 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.

ASSUNÇÃO, Ada Ávila *et al* . Incidence of Reported Flu-Like Syndrome Cases in Brazilian Health Care Workers in 2020 (March to June). **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5952, 1 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18115952>.

ATÉ 650 mil pessoas morrem por doenças respiratórias ligadas à gripe sazonal a cada ano. **OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE**, 12 de Dez. de 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/12-12-2017-ate-650-mil-pessoas-morrem-por-doencas-respiratorias-ligadas-gripe-sazonal-cada>. Acesso em 21 de Abr. de 2022.

BAIXA cobertura da vacina da gripe em 2021 e desinformação influenciaram o surto no Brasil. **Portal Butantan**, 14 de jan. de 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/baixa-cobertura-da-vacina-da-gripe-em-2021-e-desinformacao-influenciaram-o-surto-no-brasil>. Acesso em: 29 de jan. de 2022.

BAKHIEV, Moiz; TAURIN, Sebastien. SARS-CoV-2: targeted managements and vaccine development. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 58, p. 16-29, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.11.001>.

CASTRO, Luana Fernandes da Silva Oliveira *et al* . Influenza e SARS-CoV-2: distinção clínica e imunopatológica no decorrer da pandemia da covid-19. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 3, 28 mar. 2022. Revista Eletrônica Acervo Saude. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e9963.2022>.

CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay. **Center for Diseases Control and Prevention** (CDC), USA, 5 de Agos. de 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/139743/download>. Acesso em 29 de dez. de 2022.

CDC, Research Use Only CDC Flu SC2 Multiplex Assay Primers and Probes. **Center for Diseases Control and Prevention** (CDC), USA, 5 de Agos. de 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/multiplex-primer-probes.html>. Acesso em 29 de dez. de 2022.

CDC, Types of influenza Viruses. **Center for Diseases Control and Prevention** (CDC), USA, 2 de Dez. de 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>. Acesso em 29 de dez. de 2022.

CHEN, Hong *et al.* A rapid water bath PCR combined with lateral flow assay for the simultaneous detection of SARS-CoV-2 and influenza B virus. **Rsc Advances**, v. 12, n. 6, p. 3437-3444, 2022. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1ra07756b>.

CHEN, Yiyin *et al.* Aging in COVID-19: vulnerability, immunity and intervention. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101205, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2020.101205>.

CORONAVIRUS Resource Center. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE), **Johns Hopkins University (JHU)**. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 20 de dez. de 2022.

DADASHI, Masoud *et al.* COVID-19 and Influenza Co-infection: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers In Medicine**, v. 8, 25 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.681469>.

DUTRA, Ana Gabriela Stoffella. Influenza A e a sua importância no contexto brasileiro e mundial. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título Especialista. Belo Horizonte, 2017. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB-BD5NLJ/1/monografia_especializa_o_ana_gabriella_dutra.pdf.

ELDESOUKI, Raghda E. *et al.* The circulation of Non-SARS-CoV-2 respiratory viruses and coinfections with SARS-CoV-2 during the surge of the Omicron variant. **Journal Of Clinical Virology**, v. 153, p. 105215, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105215>.

FLERLAGE, Tim *et al.* Influenza vírus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 425-441, 6 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-021-00542-7>.

FUJITA, Dennis Minoru *et al.* COVID-19 and Influenza coinfection: the rise of ômicron and h3n2 in brazil ÷ 2022. **Travel Medicine And Infectious Disease**, v. 46, p. 102262-1, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102262>.

GEHA, Yuri Fadi *et al.* Análise epidemiológica comparativa entre as pandemias causadas pelos vírus Influenza A(H1N1)pdm09 e SARS-CoV-2 no estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 12, e202100862, 2021 . <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202100862>.

HAMMER, Charlotte C *et al.* High influenza vaccination coverage among healthcare workers in acute care hospitals in Finland, seasons 2017/18, 2018/19 and 2019/20. **Eurosurveillance**, v. 27, n. 17, 28 abr. 2022. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2022.27.17.2100411>.

HARAPAN, Harapan *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a literature review. **Journal Of Infection And Public Health**, v. 13, n. 5, p. 667-673, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>.

HAUSE, Ben M *et al.* Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: proposal for a new genus in the orthomyxoviridae family. **Mbio**, v. 5, n. 2, maio 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00031-14>.

HAZRA, Aniruddha *et al.* Coinfections with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 10, p. 1228-1229, 3 jul. 2020. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/ice.2020.322>.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 779-784, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>.

IULIANO, A Danielle *et al.* Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. **The Lancet**, v. 391, n. 10127, p. 1285-1300, mar. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33293-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2).

JAVANIAN, Mostafa *et al.* A brief review of influenza virus infection. **Journal Of Medical Virology**, v. 93, n. 8, p. 4638-4646, 14 abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26990>.

KIM, David; QUINN, James; PINSKY, Benjamin; SHAH, Nigam H.; BROWN, Ian. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. **Jama**, v. 323, n. 20, p. 2085, 26 maio 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.6266>.

KIM, Eun-Ha *et al.* Coinfection with SARS-CoV-2 and Influenza A Virus Increases Disease Severity and Impairs Neutralizing Antibody and CD4 + T Cell Responses. **Journal Of Virology**, v. 96, n. 6, p. 1, 23 mar. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01873-21>

KLINER, Merav; KEENAN, Alex; SINCLAIR, David; GHEBREHEWET, Sam; GARNER, Paul. Influenza vaccination for healthcare workers in the UK: appraisal of systematic reviews and policy options. **Bmj Open**, v. 6, n. 9, p. 012149, set. 2016. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012149>.

KRIGER, Or *et al.* Viral co-pathogens in COVID-19 acute respiratory syndrome – what did we learn from the first year of pandemic? **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 116, p. 226-229, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2022.01.018>.

KUMAR, Suresh *et al.* Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: a comparative computational study of spike protein. **Journal Of Medical Virology**, v. 94, n. 4, p. 1641-1649, 27 dez. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.27526>.

LI, Geng *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **Journal Of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 424-432, 7 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25685>.

LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa *et al.* As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal Of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 14 maio 2020. Instituto para o Desenvolvimento da Educacao. <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v8i1.3232.p1-9.2020>.

LIU, Long *et al.* Comparison of Clinical Features and Outcomes of Medically Attended COVID-19 and Influenza Patients in a Defined Population in the 2020 Respiratory Virus Season. **Frontiers In Public Health**, v. 9, 23 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2021.587425>.

LOBO, Renata Desordi. Fatores de risco para aquisição de influenza A (H1N1) pdm09 entre os profissionais de saúde. 2015. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.5.2015.tde-11082015-155615. Acesso em: 2022-11-06.

MAYURAMART, Orphan *et al.* Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and influenza viruses based on CRISPR-Cas12a. **Experimental Biology And Medicine**, v. 246, n. 4, p. 400-405, 5 nov. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1535370220963793>.

MEDINA, Rafael A. *et al.* Influenza A viruses: new research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590-603, 11 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2613>.

MURUGANANDAM, *et al.* Respiratory viruses among ethnic Nicobarese during COVID-19 pandemic. **Bmc Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, 14 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-022-07435-x>.

NASIR, Nosheen *et al.* Comparison of clinical characteristics and outcomes between COVID-19 pneumonia and H1N1 influenza. *Advances in Respiratory Medicine*, v. 89, p. 254–261, 2021. <http://dx.doi.org/10.5603/ARM.a2021.0049>

OU, Qiang *et al.* Clinical analysis of 150 cases with the novel influenza A (H1N1). **BioScience Trends**, v. 3, n. 4, p.127-130, 2009. Disponível em: <https://www.biosciencetrends.com/downloadpdf/228>. Acesso em: 26 de abr. de 2022.

PORMOHAMMAD, Ali *et al.* Comparison of influenza type A and B with COVID-19: a global systematic review and meta :analysis on clinical, laboratory and radiographic findings. **Reviews In Medical Virology**, v. 31, n. 3, p. 1-10, 9 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2179>.

RIBEIRO, Julival Fagundes *et al.* INFLUENZA (GRIPE). **Saúde em Foco: Doenças Emergentes e Reemergentes - Volume 1**, p. 245-270, 2020. Editora Científica Digital. <http://dx.doi.org/10.37885/201001751>.

ROCHA, Lucas. Influenza H3N2: o que explica o aumento dos casos de gripe no Brasil. **CNN BRASIL**, São Paulo, 17 de dez. de 2021. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/influenza-h3n2-o-que-explica-o-aumento-dos-casos-de-gripe-no-brasil/>. Acesso em 27 de abril, 2022.

RODRIGUES, Bruna Furlaneto *et al.* Vírus influenza e o organismo humano. **Revista APS**, v.10, n.2, p. 210-216, jul./dez. 2007. <https://www.ufjf.br/nates/files/2009/12/13virus.pdf>

SANDT, Carolien e van de *et al.* Influenza B viruses: not to be discounted. **Future Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1447-1465, set. 2015. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.65>.

SAKAMOTO, Haruka *et al.* Seasonal Influenza Activity During the SARS-CoV-2 Outbreak in Japan. **Jama**, v. 323, n. 19, p. 1969, 19 maio 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.6173>.

SCHIRMER, Patricia *et al.* Respiratory co-infections with COVID-19 in the Veterans Health Administration, 2020. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 100, n. 1, p. 115312-1, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115312>.

SELVARAJU, Suresh B.; SELVARANGAN, Rangaraj. Evaluation of Three Influenza A and B Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays and a New 2009 H1N1 Assay for Detection of Influenza Viruses. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3870-3875, nov. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02464-09>.

SHARMA, Anshika; FAROUK, Isra Ahmad; LAL, Sunil Kumar. COVID-19: a review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v13020202>.

STOWE, Julia *et al.* Interactions between SARS-CoV-2 and influenza, and the impact of coinfection on disease severity: a test-negative design. **International Journal Of Epidemiology**, v. 50, n. 4, p. 1124-1133, 3 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyab081>.

SWETS, Maaïke C *et al.* SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. **The Lancet**, v. 399, n. 10334, p. 1463-1464, abr. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00383-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00383-x).

TAUBENBERGER, Jeffery K.; KASH, John C.; MORENS, David M. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 502, p. 1-10, 24 jul. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5485>.

UNWIN, Robert J. The 1918 Influenza Pandemic: back to the future? **Kidney And Blood Pressure Research**, v. 46, n. 5, p. 639-646, 2021. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000519288>.

V'KOVSKI, Philip *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for sars-cov-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 28 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.

WHO launches new global influenza strategy. **World health organization**, Geneva, 11 de Mar. de 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>. Acesso em: 29 de dez. de 2022.

WIT, Emmie de *et al.* SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523-534, 27 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

WORLDOMETER_Coronavírus. Total Coronaviruses Cases in Brazil_junho, 15, 2020. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/brazil/>. Acesso em 10 de maio, 2022.

YADAV, Rohitash *et al.* Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 6 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10040821>.

YUE, Huihui *et al.* The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients during COVID-19 outbreak. **Journal Of Medical Virology**, v. 92, n. 11, p. 2870-2873, 6 jul. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26163>.