



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Neilton Paulo Bezerra**

**Ocorrência de vírus influenza, vírus sincicial respiratório e  
SARS-CoV-2 no período pandêmico da covid-19, em  
pessoas que vivem com HIV/aids**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Lenice do Rosário de Souza  
Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu**

**2022**

Neilton Paulo Bezerra

**Ocorrência de vírus influenza, vírus sincicial respiratório e SARS-CoV-2 no período pandêmico da covid-19, em pessoas que vivem com HIV/aids**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Associada Lenice do Rosário de Souza  
Co-orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bezerra, Neilton.

Ocorrência de vírus influenza, vírus sincicial respiratório e sars-cov-2 no período pandêmico da covid-19, em pessoas que vivem com HIV/aids / Neilton Bezerra. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Lenice do Rosário de Souza  
Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto  
Capes: 40101096

1. Influenza. 2. Vírus Sincicial Respiratório Humano.  
3. Pandemias. 4. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.  
5. AIDS (Doença) - Complicações e sequelas. 6. Sars-cov-2.  
7. COVID-19.

Palavras-chave: Covid-19; Detecção; HIV/aids; Vírus influenza; Vírus sincicial respiratório.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, quero agradecer a oportunidade de estar realizando essa pós-graduação e concluindo mais uma etapa extremamente importante, sou imensamente grato por isto. Ao meu pai que é a pessoa mais importante na minha vida, mesmo sendo uma pessoa de pouco estudo, soube muito bem passar a importância deste na minha vida. Agradeço, aos meus irmãos e especialmente a minha irmã. A Carla, minha grande e melhor amiga. Sou uma pessoa melhor por ter te conhecido. As novas pessoas que se tornaram mais do que família nessa jornada, a família Cassinelli, em especial a Tia Rosa e vó Idalina. A Arion, pelo companheirismo, força, incentivo, pela nova vida que me proporciona com todas as suas aventuras e por todo amor.

A minha querida e amada professora Adriana Piccinin, fonte de inspiração, incentivo, carinho e pela forte presença na minha vida.

Agradeço a todo pessoal que compõe o Laboratório de Biotecnologia Aplicada, por todo suporte e apoio, em especial: Maércio, Gabriela, Fabiana, Flávia e Leonardo que me ajudou imensamente em todo aprendizado prático. A Mayara, pela amizade, companheirismo e trabalho juntos durante essa jornada. A cada um dos pacientes que foram extremamente importantes na realização deste trabalho. Ao professor José Eduardo pelo apoio na análise estatística.

Agradeço a minha orientadora, a professora Lenice, por sua orientação, por me proporcionar aprender e vivenciar um outro lado da área da saúde, além do laboratório. Por toda disponibilidade, apoio, aprendizado e puxões de orelha, todas essas vivências serão importantes na minha trajetória. A minha coorientadora, a professora Rejane, pela dedicação que ela tem pela pesquisa, inspirando muitos alunos.

Agradeço a agência Capes, pela manutenção da minha bolsa durante esse período, e a todo financiamento para realização do estudo.

“Cada homem deve trilhar o seu caminho”.

## Resumo

Infecções respiratórias de vias aéreas inferiores têm sido classificadas como uma das principais causas de morte no mundo. Pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA) apresentam maior risco de infecção por agentes causadores de síndromes gripais devido à sua condição de imunossupressão. Diante disso, o objetivo desta pesquisa, foi avaliar a ocorrência de infecções respiratórias causadas pelos vírus: influenza, vírus sincicial respiratório (VSR) e SARS-CoV-2 em PVHA, no período de 2020 a 2022. Além disso, avaliar a ocorrência e mortalidade de infecções causadas pelos vírus respiratórios citados acima e identificar os fatores sociodemográficos e clínicos das PVHA. A partir, de secreções de nasorofaringe de 57 PVHA, e que apresentaram quadro gripal, foi extraído o material genético utilizando o *kit* BIOPUR Mini Spin Vírus DNA/RNA 2.0, seguido por transcrição reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) no aparelho Hybrispot 12 PCR Auto, utilizando o *kit* de detecção XGEN Multi PR24 *Flow Chip*. Após a amplificação, ocorreu hibridização reversa em um chip que é composto por uma membrana de *nylon* (tecnologia *Flow Chip*) que permite a detecção de até 24 patógenos, posteriormente os resultados dos ensaios foram validados. Das 57 PVHA, 32 (56,2%) eram do sexo masculino, com mediana de 42 anos [21 - 68] de idade. Em 36 (63,2%) pacientes houve detecção de algum vírus do painel de patógenos. Do total da casuística, 27 (47,5%) correspondiam aos três vírus estudados, sendo 18 (31,5%) do SARS-CoV-2, oito (14,0%) do VSR e um (2,0%) da influenza. Em 21 (36,8%) pacientes não foram identificados quaisquer dos vírus. Três pacientes evoluíram a óbito durante o estudo, apresentando quadro respiratório com piora progressiva e necessidade de suporte ventilatório. Nestes três casos, não houve detecção dos vírus aqui estudados, e ressalta-se, que não foi possível realização de necropsia destes pacientes. Nas 57 PVHA estudadas, houve maior ocorrência do SARS-CoV-2 (31,5%), seguido do VSR (14,0%) e influenza foi encontrado em apenas um paciente, sendo este o subtipo H3N2. O teste de Fisher para a associação entre ocorrência de detectados e não detectados entre SARS-CoV-2 e VSR mostrou que não houve associação entre a ocorrência desses dois vírus ( $p = 0,085$ ), bem como, não houve associação entre os sintomas presentes em pacientes detectados para SARS-CoV-2 e VSR ( $p = 0,8851$ ). Pelo menos uma comorbidade esteve presente no grupo com detecção de SARS-CoV-2. Por outro lado, apenas um caso (14,3%) de infecção pelo VSR apresentou

obesidade. Está claro que a covid-19 associa-se a uma gama maior de comorbidades que aumentam o risco de doença mais grave ou morte. Foi possível determinar a alta ocorrência de infecções pelo SARS-CoV-2 e VSR em pessoas que vivem com HIV/aids, aqui estudadas, não havendo diferença nos sintomas referentes a cada uma das infecções. Não houve diferença entre as cargas virais e as contagens de células T CD4+ para os três vírus. Foi possível determinar a alta ocorrência de infecções pelo SARS-CoV-2 e VSR em pessoas que vivem com HIV/aids, aqui estudadas, não havendo diferença nos sintomas referentes a cada uma das infecções.

**Palavras-chave:** Detecção, RT-PCR, covid-19, vírus influenza, vírus sincicial respiratório, HIV/aids

## Abstract

Lower respiratory tract infections have been classified as one of the leading causes of death worldwide. People living with HIV/AIDS are at greater risk of infection with agents that cause flu syndromes due to their immunosuppressive condition. Therefore, the objective of this research was to evaluate the occurrence of infections caused by the Influenza, RSV, and SARS-CoV-2 viruses in people living with HIV/AIDS during the period of 2020 to 2022. And with that, to evaluate the occurrence and mortality of infections caused by the respiratory viruses mentioned above and to identify the sociodemographic and clinical factors of people living with HIV/AIDS. Genetic material was extracted using the BIOPUR Mini Spin Virus DNA/RNA 2.0 Mini Spin Virus Kit, from nasooropharyngeal swab aspirates of 57 *people living with HIV/AIDS*, who presented with influenza, followed by reverse transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in the Hybrispot 12 PCR Auto instrument, using the XGEN Multi PR24 Flow Chip detection kit. After amplification, reverse hybridization took place on a chip that is composed of a nylon membrane (Flow Chip technology) that allows the detection of up to 24 pathogens, later the test results were validated. Of the 57 people living with HIV/AIDS, 32 (56.2%) were male, with a median age of 42 years [21 - 68]. In 36 (63.2%) patients there was the detection of some virus from the viral panel. Of the total sample, 27 (47.5%) corresponded to the three viruses studied, 18 (31.5%) of SARS-CoV-2, eight (14.0%) of RSV and one (2.0%) of influenza. In 21 (36.8%) patients, none of the viruses were identified. Three patients died during the study, both had a progressively worsening respiratory condition and required ventilatory support. In these three cases, none of the viruses studied here were detected, and it should be noted that it was not possible to perform a necropsy on these patients. In the 57 people living with HIV/AIDS studied, there was a higher occurrence of SARS-CoV-2 (31.5%), followed by RSV (14.0%), and influenza was found in only one patient, this being the H3N2 subtype. Fisher's test for the association between the occurrence of detected and undetected SARS-CoV-2 and RSV, with a p-value 0.085, showed that there was no association between the occurrence of these two viruses, it also showed that there was no association between symptoms present in patients detected for SARS-CoV-2 and RSV, p-value 0.8851. Therefore, the occurrence proportions are not significant when compared. At least one comorbidity was present in the group with detection of SARS-CoV-2. On the other hand, only one (14.3%) case of RSV infection was obese. It is clear that Covid-19 is associated with a wider range of comorbidities that increase the risk of more serious illness or death. It was possible to determine the high occurrence of infections by SARS-COV-2 and RSV in people living with HIV/AIDS, studied here, with no difference in the symptoms referring to each infection. There were no significant values between viral loads and CD4+ T cell counts for the three viruses. It was possible to determine the high occurrence of SARS-CoV-2 and RSV infections in people living with HIV/aids, studied here, with no difference in the symptoms referring to each of the infections.

**Keywords:** Detection, COVID-19, influenza virus, respiratory syncytial virus, hiv/aids

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – estrutura do Vírus Sincicial Respiratório - VSR .....	16
<b>Figura 2</b> – linha do tempo mostrando as relações temporais e genéticas de rearranjo entre cada um dos subtipos de influenza A com potencial pandêmico .....	19
<b>Figura 3</b> – distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal, por semana epidemiológica de inícios dos sintomas [compreende dez de 2018 a dez de 2019] .....	20
<b>Figura 4</b> – método para coleta de <i>swab</i> nasofaríngeo. Botucatu 2022.....	27
<b>Figura 5</b> – equipamento Hybrispot 12 PCR AUTO (arquivo do laboratório) Botucatu, 2022 .....	29
<b>Figura 6</b> – chip com sondas marcadas após hibridização reversa (Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu) Botucatu, 22.....	30

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** – características clínicas e sociodemográficas dos 57 pacientes que vivem com HIV/aids, apresentaram quadro gripal e foram incluídos no estudo. Botucatu, 2022 .....31

**Tabela 2** – principais comorbidades reportados pelos 27 pacientes que vivem com HIV/aids, com detecção dos vírus SARS-CoV-2 e sincial respiratório, incluídos no estudo. Botucatu, 2022 .....35

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1** – ocorrência de infecções causadas pelos vírus SARS-CoV-2, vírus sincicial respiratório (VSR) e influenza, em 57 pacientes que vivem com HIV/Aids, incluídos no estudo. Botucatu, 2022 .....32
- Gráfico 2** – associação entre ocorrência de SARS-CoV-2 e VSR para detectados e não detectados. Botucatu, 2022.....33
- Gráfico 3** – principais sintomas clínicos reportados pelos 27 pacientes que vivem com HIV/Aids, com detecção dos vírus SARS-CoV-2 e sincicial respiratório, incluídos no estudo. Botucatu, 2022 .....34

## Lista de Quadros

- Quadro 1** – distribuição dos óbitos de Síndrome Respiratória Aguda Grave por influenza segundo fator de risco [compreende dez de 2018 a dez de 2019] .....21
- Quadro 2** – Critérios para inclusão dos pacientes no estudo. Botucatu 2022 .....25

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

HIV	<i>Human Virus Immunodeficiency</i>
PVHA	Pessoa que vive com HIV/Aids
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
SAE	Serviço de Ambulatórios Especializados
HC	Hospital das Clínicas
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
TARV	Terapia Antirretroviral
T CD4+	Linfócito T do tipo CD4
T CD8+	Linfócito T do tipo CD8
IRA	Infecção Respiratória Aguda
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/Aids
RNA	Ácido Ribonucleico
BVA	Bronquiolite Viral Aguda
H1N1	Heamglutinina-1/ Neuroaminidase-1
H2N2	Heamglutinina-2/ Neuroaminidase-2
H3N2	Heamglutinina-3/ Neuroaminidase-2
SG	Síndrome Gripal
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
COVID-19	Coronavirus Disease

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 Infecção pelo HIV e SARS-CoV-2 .....	13
1.2 Vírus Sincicial Respiratório.....	16
1.3 Vírus Influenza .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 DELINEAMENTO .....	25
4.2 CASUÍSTICA E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	25
4.3 LOCAL DO ESTUDO .....	25
4.4 COLETA DE DADOS.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b> .....	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>APÊNDICE</b>	
<b>ANEXO</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Infecção pelo HIV e SARS-CoV-2

Os primeiros casos de infecção causada pelo HIV foram relatados em 1981 nos Estados Unidos da América (EUA), Haiti e África Central e, após quase 40 anos, a prevenção ainda é a principal defesa contra a infecção <sup>1</sup>.

Atualmente, existem cerca de 37,7 milhões de pessoas convivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da aids, no mundo. Em 2020, 1,5 milhão de pessoas foram infectadas pelo HIV, e no mesmo ano, pelo menos 680.000 [480 000-1,0 milhões] morreram por doenças relacionadas à aids. Por outro lado, a ação da terapia antirretroviral (TARV) combinada reduziu a morbimortalidade relacionada à doença, o que deixou de ser uma sentença de morte. Além disso, a taxa de mortalidade por HIV/aids sofreu decréscimo de 51%, entre 2004 e 2017, quando foram registradas 940.000 mortes <sup>2</sup>.

No Brasil, foram notificadas 1.045.355 pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA) desde o início da epidemia, em 1980 até junho de 2021, sendo que em 2017 foram diagnosticados 42.200 novos casos e foram registradas 11.463 mortes que tiveram a aids como causa básica <sup>3</sup>. O dano progressivo do sistema imunológico é uma preocupação central em PVHA. Entre as células que se infectam pelo HIV, o linfócito T CD4+ é o principal alvo, levando à imunodepressão, o que torna o indivíduo mais suscetível às doenças oportunistas, incluindo neoplasias <sup>3,4</sup>.

Contagens baixas de linfócitos T CD4+ e elevadas cargas virais plasmáticas do HIV estão relacionadas também a distúrbios inflamatórios e metabólicos. O controle adequado destes distúrbios nas PVHA contribui para melhor qualidade e aumento da expectativa de vida <sup>5,6</sup>. Segundo autores <sup>6,7</sup>, a proporção de PVHA que não apresenta resposta imunológica, o não respondedor imunológico, varia de 15% a 44%. Alguns estudos relacionam essa situação à ausência de definição e uniformidade da resposta imune ideal e, também, pelas limitações impostas pelo método de contagens de linfócitos T CD4+, que é usado como único marcador de reconstituição imune disponível na prática clínica <sup>8</sup>.

Existem inúmeras discussões sobre a relevância de possíveis fatores de risco envolvidos na resposta imunológica ao vírus, tais como, idade avançada no

início do tratamento, baixas contagens iniciais de células T CD4+ e o uso prévio de drogas injetáveis <sup>8,9</sup>.

Em geral, após seis meses do início da TARV a maioria das PHVA apresenta cerca de 50 células/mm<sup>3</sup> a mais de T CD4+ no sangue periférico e, após um ano é observado aumento de 100 células/mm<sup>3</sup>, além de resposta virológica completa, ou seja, carga viral plasmática abaixo do limite de detecção. Esses mesmos estudos demonstraram que a mortalidade por infecções oportunistas diminui quando os pacientes atingem pelo menos 350 células T CD4+/mm<sup>3</sup> após a terapia <sup>10, 11</sup>.

PVHA com baixas contagens de linfócitos T CD4+ estão mais suscetíveis a doenças cardiovasculares, renais, hepáticas, neurológicas e ósseas, bem como cânceres. Durante a infecção pelo HIV não tratada, as contagens de T CD8+ aumentam à medida que a contagem de T CD4+ diminui. Quadro semelhante também está presente em adultos idosos, não infectados pelo HIV, sendo que a inversão da relação CD4+/CD8+ é um marcador preditor de senescência das células T, que pode levar ao aumento na taxa de mortalidade <sup>12,13</sup>.

As infecções respiratórias agudas são as doenças infecciosas mais frequentes em seres humanos, sendo os vírus seus principais agentes etiológicos. Neste contexto, há preocupação com o surgimento de patógenos emergentes e a identificação de vírus respiratórios circulantes. Uma das principais estratégias para o sistema de notificação e investigação em vigilância para esses agentes ocorre por meio do estabelecimento de unidades sentinela, presentes no mundo todo e que têm contribuído para o conhecimento sobre a epidemiologia da influenza, e outros patógenos. A vigilância da influenza no Brasil é composta pela vigilância sentinela de Síndrome Gripal (SG) e de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) <sup>14,15,16</sup>.

Na atual pandemia de covid-19, as unidades sentinelas de influenza têm desempenhado importante papel na vigilância da magnitude e dispersão do agente etiológico, o vírus SARS-CoV-2 <sup>17</sup>. Mesmo apresentando distribuição global, incluindo vários centros no Brasil, sua abrangência limita-se a um número de casos ambulatoriais, somados às internações por SRAG <sup>18</sup>.

É importante salientar a existência de campanhas anuais de vacinação como forma de prevenção da influenza, apesar da vacina não apresentar efetividade total na proteção contra o vírus, ela é uma das principais ferramentas desenvolvidas que visa proteger grupos mais vulneráveis contra doenças respiratórias causadas

por outros agentes virais que poderiam impactar no sistema imunológico e favorecer o surgimento de outras infecções, que podem levar à ocorrência de casos graves. Além disso, entre os grupos imunizados, ocorre uma menor procura dos prontos socorros e dos hospitais, diminuindo internações e mortes, mantendo, assim, o sistema de saúde mais efetivo e adequado. Há ainda diminuição da transmissão viral, o que facilita o diagnóstico mais preciso da infecção pelo coronavírus <sup>19,20</sup>.

Estudos realizados na Inglaterra e África do Sul indicam que a chance de morrer por consequência da covid-19 entre as pessoas que vivem com HIV é o dobro da população geral. Nesse contexto, tratando-se de uma doença emergente, a covid-19, é necessário analisar os impactos que esta pode causar em grupos de risco, incluindo os imunossuprimidos que sabidamente podem apresentar maior risco de desenvolvimento da forma grave da doença <sup>21</sup>. Diante disso e considerando a escassez de dados associando covid-19 e PVHA, é extremamente importante avaliar os diferentes desfechos clínicos e riscos da covid-19 nessa população.

Atualmente, há muita preocupação com a covid longa, já existindo relatos de pacientes imunossuprimidos com a presença do SARS-CoV-2 no organismo de indivíduos por mais de 300 ou 500 dias. Além disso, imunocomprometidos podem apresentar excreção viral muito mais prolongada, como tem sido relatado em algumas infecções virais, tornando-se um risco para o vírus desenvolver novas mutações e variantes de escape do sistema imune <sup>22</sup>. Portanto, é importante estudar, a ocorrência de aspectos imunológicos de covid longa em imunossuprimidos e PVHA, quando for o caso.

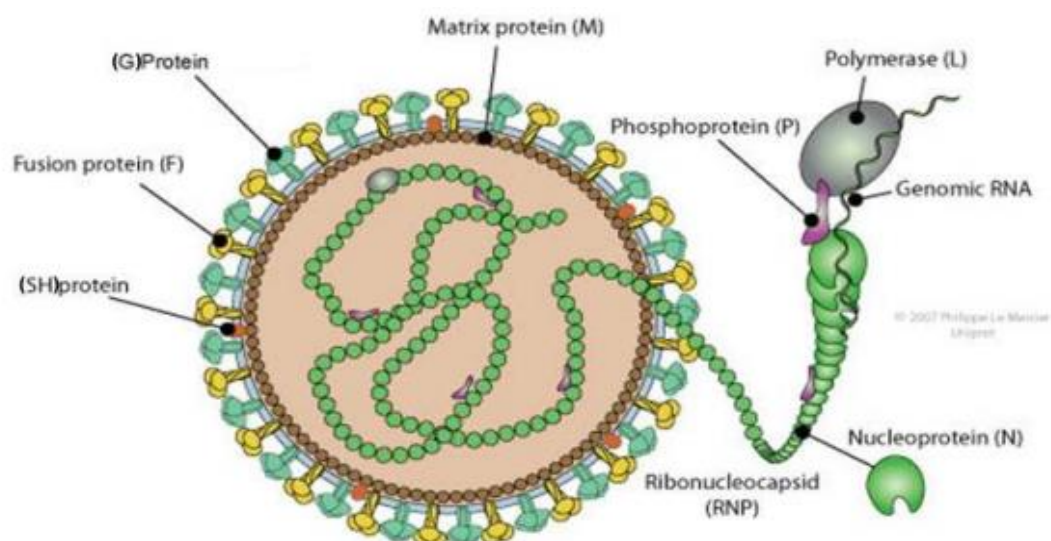
Além do vírus influenza, existem outros patógenos que têm se tornado alarmantes por causarem a SRAG, com maior frequência em adultos, o Vírus Sincicial Respiratório (VSR), um dos patógenos mais frequentemente envolvidos nas infecções respiratórias de bebês prematuros, nos primeiros anos de vida. Os casos de infecção por VSR ocorrem principalmente durante o inverno e no início da primavera, ou seja, são sazonais <sup>21,22</sup>. Ainda não existe uma vacina eficaz contra a infecção pelo VSR, porém, crianças que podem desenvolver a forma mais grave da doença podem fazer uso de anticorpo ou imunoglobulina monoclonal humana. Não existe também vacina ou composto equivalente para adultos, e mesmo que desenvolvam quadros mais leves, comparado a um resfriado, o VSR tende a agravar os casos de covid-19 <sup>23</sup>.

Atualmente, são poucos os estudos abordando com maior profundidade o impacto desses vírus (SARS-CoV-2; VSR e Influenza) em PVHA, bem como sua frequência em infecções respiratórias, além dos possíveis impactos nas contagens de linfócitos T CD4+, na progressão para aids e mortalidade <sup>14,24</sup>. Estudos recentes de coorte realizados com PVHA indicam que o risco de infecção por SARS-CoV-2 é maior quando comparados com a população geral, inclusive naqueles que já são soropositivos, porém controlados com uso regular de terapia antirretroviral (TARV), contagens de linfócitos T CD4+ maior do que 200 células/mm<sup>3</sup> e com carga viral suprimida <sup>25,26</sup>. Ainda é dito que o risco de mortalidade em PVHA está associado aos fatores de risco conhecidos para covid-19, tais como, idade mais avançada, presença de comorbidades incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias crônicas e obesidade <sup>27</sup>.

## 1.2 Vírus Sincicial Respiratório

As infecções respiratórias agudas de vias aéreas são responsáveis, na pediatria, por muitos atendimentos, visitas a serviços de emergência e hospitalizações. O VSR é o principal agente causador dessas infecções em lactentes jovens, com grande impacto na saúde dos mesmos em curto e em longo prazo <sup>28,29,30</sup>.

O VSR é um RNA vírus, não segmentado, envelopado, da família *Paramyxoviridae*, responsável por causar infecção aguda do trato respiratório em indivíduos de todas as idades, mas predominantemente em crianças (Figura 1) <sup>31</sup>.



**Figura 1** - Estrutura do vírus sincicial respiratório.

A maioria das crianças é infectada no primeiro ano de vida e, virtualmente, todas as crianças serão expostas ao vírus até o final do segundo ano de idade, com reinfecções durante toda a vida. Entretanto, o acometimento de vias aéreas inferiores, e conseqüentemente, as formas graves da doença, predominam na primo-infecção. Em lactentes jovens, a presença de anticorpos neutralizantes em elevados títulos, adquiridos passivamente durante a vida fetal, está associada com menor risco de hospitalização <sup>32</sup>.

O VSR é um dos principais agentes etiológicos das infecções que acometem o trato respiratório inferior entre lactentes e crianças menores de 2 anos de idade, podendo ser responsável por 41,7% a 83,6% dos casos de bronquiolite viral aguda (BVA) no mundo. No Brasil, uma coorte com 5.304 crianças menores de 1 ano mostrou que 2,1% delas foram hospitalizadas por BVA <sup>33</sup>. Outros trabalhos mostram o VSR como responsável por 31,9% a 64,0% das internações por BVA. Ele atinge o trato respiratório pelo contato direto com secreções respiratórias de pessoas infectadas ou por meio de superfícies e objetos contaminados. A infecção ocorre quando o material infectado atinge o organismo através da membrana mucosa dos olhos, boca e nariz ou pela inalação de gotículas derivadas de tosse ou espirro <sup>33,34</sup>.

Conhecido principalmente por causar infecções em crianças jovens, o VSR tem ganhado destaque por causar síndromes agudas graves em pessoas adultas com maior frequência <sup>35</sup>. Dados epidemiológicos indicam que o VSR tem sido o segundo causador da SRAG em adultos no ano de 2022, ficando atrás apenas do SARS-CoV-2, causador da pandemia de covid-19. De acordo com o Boletim Epidemiológico divulgado em março de 2022, a prevalência entre os casos com resultado positivo para vírus respiratórios foi de 1,3% para influenza A, 0,3% para influenza B, 15,8% para VSR e 73,8% para SARS-CoV-2. Entre os óbitos, a presença destes mesmos vírus entre os positivos foi de 0,7% para influenza A, 0,0% para influenza B, 0,1% para VSR, e 98,5% para SARS-CoV-2 <sup>36</sup>. Portanto, é preocupante o aumento no número de casos de SRAG causada por vírus respiratórios, assim como o evidente aumento do VSR, um patógeno frequente em períodos sazonais, indicando um risco maior, tanto para crianças quanto para grupos de risco com doença ou condição pré-existente, tais como, indivíduos imunossuprimidos <sup>24,36</sup>.

PVHA são focos de vigilância para casos de SRAG. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a pneumonia é uma das principais causas globais de morte em pacientes HIV positivos. O Ministério da Saúde promove a vigilância de SRAG, cuja definição passa pelo pré-requisito da Síndrome Gripal (SG), que é definida por início súbito de sintomas, tais como, tosse ou odinofagia e cefaleia ou mialgia ou artralgia <sup>37</sup>. PVHA e outros indivíduos imunossuprimidos podem ser infectados por VSR e apresentar diferentes graus de gravidade e desfechos que vão desde a recuperação completa, até insuficiência respiratória progressiva e morte. O VSR é claramente reconhecido como um patógeno que acomete todas as faixas etárias, tanto em pessoas imunocompetentes quanto imunocomprometidas, incluindo pacientes submetidos a transplantes hematopoiéticos de células-tronco ou de pulmão <sup>38</sup>.

Atualmente, não há tratamento específico para a infecção por VSR. As medidas de suporte são sempre recomendadas, além daquelas preventivas e de controle da infecção <sup>38</sup>. No entanto, há profilaxia com anticorpo monoclonal específico, o palivizumabe, que é capaz de prevenir formas graves da doença e vem sendo recomendados diferentes esquemas em diversos países, o que tem diminuído o número de hospitalizações por essas infecções. Porém, devido ao seu elevado custo, muito se discute em relação às diretrizes de sua utilização <sup>39</sup>.

Ainda são poucos os estudos na literatura atual sobre a infecção pelo VSR em PVHA e seu manejo clínico, havendo lacunas acerca dessa infecção, que normalmente é mais longa nessa população <sup>39,40</sup>.

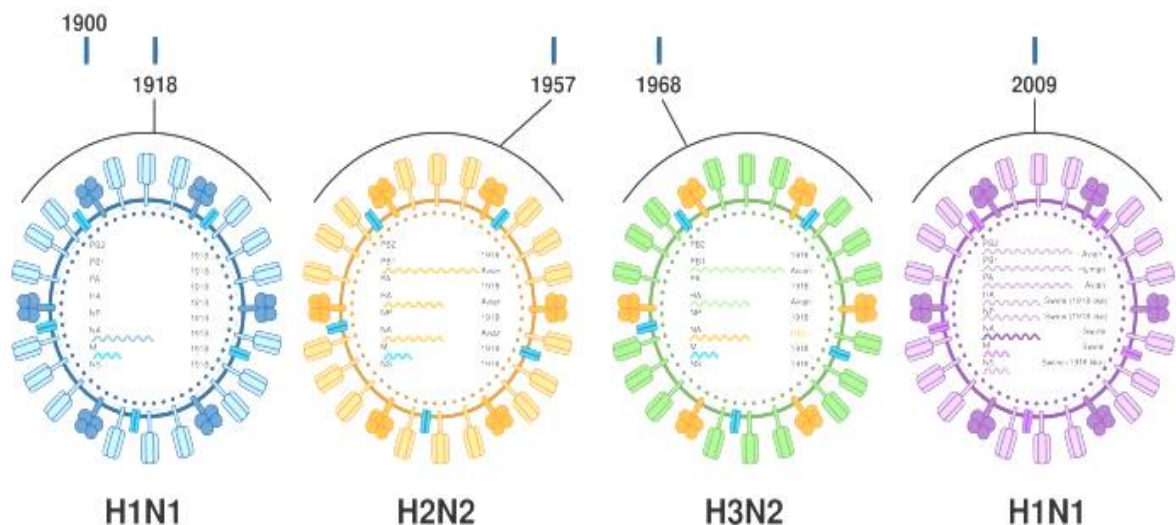
### **1.3 Vírus Influenza**

A influenza ou gripe, é uma doença infecciosa aguda de origem viral que acomete o trato respiratório, cujo agente etiológico é o *Orthomyxovirus influenzae*, também denominado vírus influenza. A infecção varia desde quadros brandos, aparentemente assintomáticos, até insuficiência respiratória aguda. Tem início abrupto com febre acima de 38°C, cefaleia, calafrios e tosse seca acrescidos de mialgia, prostração, anorexia, lacrimejamento excessivo, rinorreia, hiperemia conjuntival e eventualmente diarreia <sup>41</sup>. Os vírus influenza são partículas envelopadas de RNA de fita simples segmentada e subdividem-se nos tipos A, B e C, sendo os do tipo A e B com maior relevância clínica em humanos. Uma grande

diversidade de vírus influenza circula pelo mundo, de modo endêmico, cada qual aparecendo e ressurgindo em épocas distintas e conferindo letalidade variável <sup>39,42</sup>.

O vírus influenza apresenta altas taxas de mutação, o que resulta frequentemente na inserção de novas variantes virais na comunidade, para as quais a população não apresenta imunidade <sup>40,43</sup>.

Eles são nomeados de acordo com a variedade de glicoproteínas de superfície, denominadas hemaglutinina (H) e neuroaminidase (N), por exemplo: A H1N1, A H3N2 etc. Tendo em vista a grande variedade de hemaglutininas (n=18) e neuroaminidasas (n=11), e que os vírus sofrem constantes mutações adaptativas em seus receptores, que lhes confere a habilidade de adentrar em outras células humanas, por vezes, adquirindo potencial pandêmico. Ao longo do tempo, houve quatro pandemias de influenza desde a virada do século XX, conforme é visto na figura 2, ocorrendo em 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) e 2009 (H1N1). Esta linha do tempo mostra as relações de rearranjo temporal e genético entre cada um dos subtipos de influenza A com potencial pandêmico <sup>43,44</sup>.



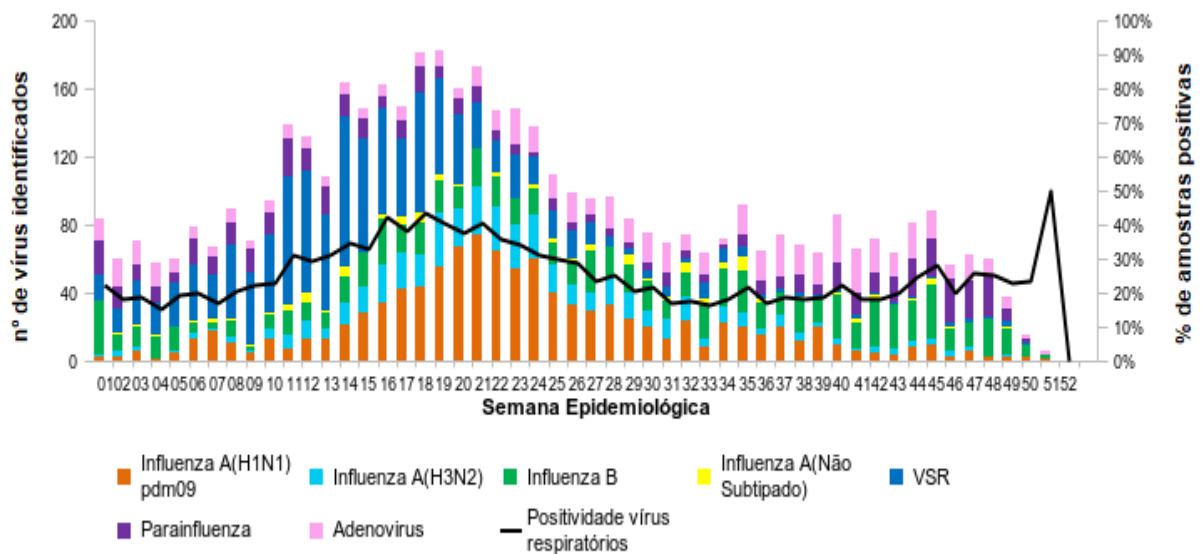
**Figura 2** – linha do tempo mostrando as relações temporais e genéticas de rearranjo entre cada um dos subtipos de influenza A com potencial pandêmico <sup>43</sup>.

cardiopatas, obesos e indivíduos imunossuprimidos, independentemente de quais subtipos de influenza apresentam maior potencial de infecção, é importante ressaltar que surtos e epidemias com diferentes subtipos de influenza são reportados esporadicamente ao longo da história <sup>45</sup>.

No Brasil, a vigilância da influenza é composta pela vigilância sentinela de síndrome gripal e de SRAG em pacientes hospitalizados. A vigilância sentinela tem

como objetivo principal, identificar os vírus respiratórios circulantes, permitir o monitoramento da demanda de atendimento dos casos hospitalizados e óbitos para orientar na tomada de decisão em situações que requeiram novos posicionamentos do Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais <sup>46</sup>.

De acordo com o boletim epidemiológico de dezembro de 2018 a dezembro de 2019 <sup>45,46</sup>, foram notificados mais de 40 mil casos de SRAG, destes cerca de 5.800 causados por influenza, com predomínio do subtipo H1N1 em cerca de 3.400 casos, e 830 casos do subtipo H3N2. Além de outros vírus respiratórios, houve grande predomínio da circulação de VSR neste período, cerca de 1.100 casos, como pode ser visto na figura 3. Esses dados epidemiológicos são extremamente importantes no controle, prevenção e enfrentamento de possíveis surtos e epidemias, uma vez que, eles tendem a ocorrer anualmente. Além disso, há predomínio maior dos subtipos H1 e H3 em indivíduos a partir dos 10 anos de idade.



**Figura 3** – Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal, por semana epidemiológica de inícios dos sintomas [compreende dez de 2018 a dez de 2019].

O Brasil apresenta índice de mortalidade de 0,5/100.000 habitantes, sendo o estado de São Paulo o maior representante desse coeficiente, com 24,5% do total de óbitos em relação ao país. Dentre os indivíduos que evoluíram ao óbito por influenza, a mediana da idade foi de 55 anos, e 73,8% apresentaram pelo menos

um fator de risco, com destaque para adultos com 60 anos ou mais, cardiopatas, diabéticos, pneumopatas e imunossuprimidos <sup>46</sup>, como podemos observar no quadro 1.

**Quadro 1** - Distribuição dos óbitos de síndrome respiratória aguda grave por influenza, segundo fator de risco [compreende dez de 2018 a dez de 2019] <sup>47</sup>.

Óbitos por Influenza (N = 1.122)	n	%
<b>Com Fatores de Risco</b>	<b>820</b>	<b>73,1%</b>
Adultos ≥ 60 anos	448	54,6%
Doença cardiovascular crônica	298	36,3%
Pneumopatas crônicas	139	17,0%
Diabete mellitus	229	27,9%
Obesidade	80	9,8%
Doença Neurológica crônica	73	8,9%
Doença Renal Crônica	69	8,4%
<b>Imunodeficiência/Imunodepressão</b>	<b>75</b>	<b>9,1%</b>
Gestante	12	1,5%
Doença Hepática crônica	22	2,7%
Criança < 5 anos	96	11,7%
Puérpera (até 42 dias do parto)	2	0,2%
Indígenas	5	0,6%
Síndrome de Down	11	1,3%

Tem sido observado que PVHA apresentam excreção viral mais prolongada, indicando que deve haver atenção maior em relação a esse grupo e ao protocolo de enfrentamento quando apresentarem síndrome gripal <sup>47</sup>, além disso, há necessidade de estudos que possam descrever melhor a dinâmica da infecção nesse grupo. A excreção do vírus ocorre em espécimes no trato respiratório, podendo ser detectada 24 horas antes do início dos sintomas, atingindo um pico entre 24 e 48 horas de sintomas e decaindo rapidamente até praticamente desaparecer entre o quinto e o décimo dias de doença. Portanto, idealmente, a pesquisa viral por *swab* nasoro-faríngeo deve ocorrer até o terceiro dia de início dos sintomas, ou seja, o pico maior de sintomas. Em imunocomprometidos, o período de excreção viral parece ser mais prolongado, com relatos de até 62 dias após o início dos sintomas em pacientes com neoplasias hematológicas <sup>47,48</sup>.

Alguns pontos interessantes quando tratamos da condição de infecção dupla HIV-influenza, está no fato de que a infecção pelo HIV parece ser um fator de risco para aquisição de influenza e em maior tempo para o clareamento viral, o que

tem sido observado em crianças e em outras condições imunossupressoras <sup>48</sup>. No entanto, não está claro se a imunodepressão pelo HIV pode determinar a evolução para quadro grave de influenza acarretando aumento da morbimortalidade. Enquanto alguns autores sugerem que essa relação entre a infecção pelo HIV e a maior gravidade existe <sup>48,49</sup>, outros demonstram não haver diferença nas taxas de admissão em Unidades de Terapia Intensiva e de mortalidade, quando comparadas com indivíduos HIV-negativos. Mas ressaltam que 81,0% dos soropositivos receberam terapia antiviral específica para influenza pandêmica A (H1N1) <sup>50</sup>. Resultado semelhante demonstrou que em relação à infecção por H1N1 e a evolução para pneumonia, a taxa de hospitalização e insuficiência respiratória em 56 pacientes HIV positivos em uso de TARV, dos quais 95,0% apresentavam carga viral abaixo do limite de 50 cópias, demonstrando não haver diferença quando comparado com a população soronegativa <sup>51</sup>.

Por outro lado, um estudo realizado nos EUA, em população idosa, com 60 anos ou mais e que vive com HIV, mostrou que em 2004 a mortalidade por influenza foi significativamente maior quando comparada à população soronegativa pareada pela idade <sup>52</sup>. Esse dado demonstra que a associação de fatores, tais como, sociodemográficos, histórico de doenças e infecções, aumentam as taxas de mortalidade, dessa forma, pode ser considerado um risco maior para as PVHA. Outros estudos demonstraram que os indivíduos sem TARV, com contagem de T CD4+ baixa e comorbidades cardiorrespiratórias, associaram-se com evolução grave da infecção por influenza, além de risco aumentado para complicações <sup>47,52</sup>. Portanto, considerando a susceptibilidade e a presença de fatores de risco entre influenza e HIV, justifica-se o fato de as PVHA serem um dos focos de campanhas de vacinação contra influenza no Brasil <sup>53,54</sup>.

Diante disso, há necessidade de estudos que possibilitem a melhor compreensão das infecções respiratórias agudas e síndromes respiratórias agudas em PVHA, e através disso, auxiliar nas medidas de vigilância, controle e enfrentamento desses patógenos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os patógenos, influenza, VSR e SARS-CoV-2, correspondem a frequentes causadores de doenças respiratórias e síndromes agudas em todo o mundo. PVHA são importante grupo de risco para ocorrência dessas infecções, considerando sua imunossupressão. São poucos os trabalhos na literatura científica que avaliaram a ocorrência desses vírus em PVHA, sendo de interesse compreender a dinâmica dessas infecções respiratórias nessa população, entender melhor a vigilância virológica e eventualmente avaliar a evolução na aids. Assim, seria relevante a realização deste estudo por não se conhecer quaisquer desses aspectos da associação dessas infecções no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia, Domingos Alves Meira.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi avaliar a ocorrência de infecções causadas pelos vírus influenza, VSR e SARS-CoV-2 em PVHA, e com isso a caracterização dos aspectos clínicos e etiológicos das principais síndromes gripais causadas por estes patógenos, no período pandêmico da covid-19.

Os objetivos específicos foram:

- avaliar a ocorrência e mortalidade de infecções causadas pelos vírus respiratórios citados acima;
- identificar os fatores sociodemográficos e clínicos das PVHA.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO

Tratou-se de estudo descritivo, realizado a partir de amostras coletadas anteriormente e, testadas com as técnicas propostas no estudo. Os dados de prontuários, características clínicas e resultados de exames laboratoriais foram coletados da lista de pacientes que realizaram coleta de amostras para diagnóstico de síndrome gripal.

### 4.2 CASUÍSTICA E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram estudados 57 PVHA que se enquadraram nos critérios de inclusão, no período de maio de 2020 a junho de 2022. Os critérios para inclusão dos pacientes no estudo, estão descritos no quadro 2.

**Quadro 2** – Critérios para inclusão de pacientes no estudo. Botucatu, 2022.

• Idade igual ou superior a 18 anos
• Diagnóstico de infecção pelo HIV
• Em uso ou não de TARV
• Carga viral e linfócitos T CD4+
• Apresentar quadro gripal
• Coleta por <i>swab</i> nasoorofaríngeo

Legenda: TARV – Terapia Antirretroviral; HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana; T CD4+ - Linfócitos do tipo T CD4+

### 4.3 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado com pacientes em seguimento no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), do Complexo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. É Instituição própria da Fundação para o Desenvolvimento Médico Hospitalar (FAMESP) e é referência para o atendimento de PVHA na região de Botucatu, do Departamento Regional de Saúde VI – Bauru (DRS-VI), que compreende os municípios que constituem o Polo Cuesta e o Vale do Jurumirim, cuja população

estimada é de 600.000 habitantes. São atendidos atualmente no Serviço cerca de 1.000 PVHA.

#### 4.4 COLETA DE DADOS

O presente trabalho faz parte de um projeto maior, intitulado Covid-19 e além: estabelecimento de um observatório de sinais precoces de doenças potencialmente pandêmicas e emergências de saúde pública de relevância internacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, com o parecer de número 4.538.561.

A coleta de dados e os exames laboratoriais para identificação dos três vírus estudados foram realizados pelo próprio pesquisador. Para obtenção dos resultados de contagens de linfócitos T CD4+ e cargas virais plasmáticas do HIV foi consultado o Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL), do Ministério da Saúde, que são realizados na rotina do atendimento ambulatorial no Serviço<sup>54</sup>.

As metodologias moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB).

Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos pela análise dos prontuários eletrônicos dos pacientes, nos quais constavam as avaliações médicas nas consultas e as solicitações das coletas de *swabs* nasoorofaríngeos. Abaixo está descrito o método de coleta por *swab* que foi utilizado para obtenção das amostras:

1. Foi utilizado *swab* de *Rayon* estéril;
2. A fossa nasal dos pacientes foi examinada com o intuito de verificar a presença de secreções. O objetivo do *swab* é colher um esfregaço de células e não secreção nasal;
3. Deslocando a ponta do nariz para cima com o dedo polegar e inclinando-se a cabeça do paciente, o *swab* era introduzido na cavidade nasal (cerca de 5 cm), direcionando-o para cima (direção dos olhos), com uma angulação de 30° a 45° em relação ao lábio superior. É importante certificar-se que o *swab* ultrapassou superiormente o corneto inferior atingindo o meato médio, como descrito na figura 4;



**Figura 4** – Método para coleta de *swab* nasofaríngeo. Botucatu, 2022.

Fonte: Lacen-RS. 2018

4. Após a introdução, o coletor era esfregado com movimentos circulares delicados, pressionando-o contra a parede lateral do nariz (em direção à orelha do paciente). Em seguida, era removido o coletor do nariz do paciente cuidadosamente e introduzido, imediatamente, no tubo com solução fisiológica. Foram colhidos *swabs* nas duas narinas (um *swab* para cada narina) <sup>56</sup>.

As amostras coletadas foram armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservação e posterior processamento.

A partir, de amostras da nasoorofaringe de 57 pacientes soropositivos para HIV foi extraído o material genético utilizando-se o *Kit* Biopur extração mini spin vírus DNA/RNA 2.0 com modificações.

O Apêndice 1, mostra as adaptações realizadas, que envolvem alteração no tempo de lavagem, especificamente com o tampão de lavagem 2 para uma etapa mais longa e com menos manipulação dessa amostra. Além disso, na etapa de eluição, foi utilizada água livre de enzimas DNase e RNase.

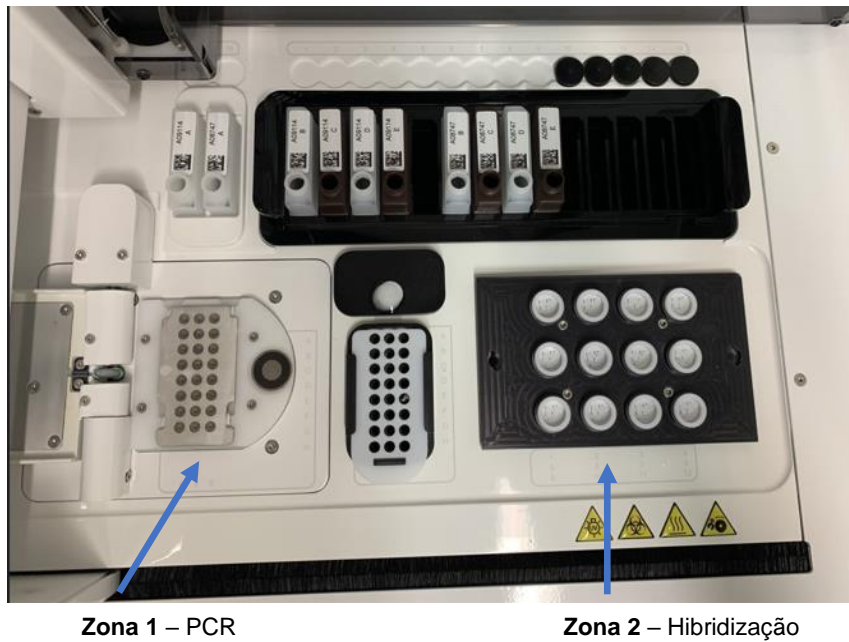
Após a extração, foi realizada a amplificação simultânea de DNA/RNA por transcrição reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para cada amostra individualmente, seguindo as condições de ciclagem: uma vez a  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 min; uma vez a  $50^{\circ}\text{C}$  por 20 min; uma vez a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min; 45 vezes a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30-60 s e uma vez a  $8^{\circ}\text{C}$  <sup>55</sup>.

Na etapa de PCR também foi realizada adaptação que envolvia a utilização de 5  $\mu\text{L}$  do produto extraído.

Após etapa de RT-PCR, realizou-se a hibridização reversa por *dot blot* com sondas específicas imobilizadas para cada patógeno, em um *chip* que é composto por uma membrana de *nylon* (tecnologia *Flow Chip*). O *kit* de detecção

utilizado para os alvos genômicos foi o *Kit Multiplex PR24 Flow Chip* automatizado – 24RX. O aparelho Hybrispot 12 PCR AUTO apresenta um painel de 21 vírus e três bactérias, portanto, permitindo a detecção de até 24 patógenos causadores de infecções respiratórias em uma única amostra, sendo eles, Adenovírus humano, Bocavírus humano, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, Coronavírus 229E, Coronavírus HKU1, Coronavírus NL63, Coronavírus OC43, Coronavírus SARS-CoV-2, Coronavírus SARS-like, Enterovírus, Metapneumovírus humano, *Mycoplasma pneumoniae*, Rinovírus humano, Vírus Influenza A, Vírus Influenza A subtipo H1N1, Vírus Influenza A subtipo H3, Vírus Influenza B, Vírus Parainfluenza 1, Vírus Parainfluenza 2, Vírus Parainfluenza 3, Vírus Parainfluenza 4, Vírus Sincicial Respiratório A e B, <sup>55</sup>.

O equipamento Hybrispot, figura 5, é uma plataforma totalmente capaz de automatizar todos os processos de amplificação, desnaturação e hibridização através do vácuo vertical e temperaturas controladas. A plataforma é baseada na tecnologia DNA-FLOW, que oferece um sistema de diagnóstico para análises rápidas e simultâneas de vários biomarcadores, tanto de DNA quanto de proteínas, por *dot blot* reverso. Esta tecnologia permite que as moléculas alvo atravessem a membrana de *nylon* no *chip* através do fluxo vertical para hibridizar com suas sondas complementares imobilizadas nessa matriz porosa em um ambiente tridimensional, em oposição à hibridização em uma superfície convencional <sup>55</sup>.



**Figura 5:** Equipamento HybrisSpot 12 PCR AUTO (arquivo do Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu). Botucatu, 2022.

Após o ensaio (aproximadamente 3 horas e meia), os *chips* foram analisados a olho nu por meio da leitura visual da marcação na membrana de *nylon* e, posteriormente os resultados foram validados, figura 6. Todo o processo de validação foi realizado no próprio aparelho, fazendo as devidas correções e eliminação de possíveis resultados errôneos, como por exemplo, a presença de algum artefato na membrana do *chip* que poderia levar a um resultado falso.



**Figura 6:** *Chip* com sondas marcadas após etapas de RT-PCR e hibridização reversa (arquivo do Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu). Botucatu, 2022.

Com os dados obtidos, uma análise descritiva inicial foi feita com o cálculo de médias, desvios-padrão, valores mínimo e máximo, e medianas para variáveis quantitativas e frequências e percentuais para variáveis categorizadas. Comparações de médias para variáveis quantitativas para ocorrência de SARS-CoV-2 ajustando um modelo Poisson ou binomial negativa em caso de extra variação seguido do teste de comparação múltipla de Wald. As associações para variáveis categorizadas e ocorrência de SARS-CoV-2 e VSR foram avaliadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. O mesmo teste foi aplicado para sintomas.

Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas utilizando o programa *SAS for Windows*, v.9.4.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos 57 pacientes avaliados previamente para caracterização clínica pelo médico assistente e enquadrados nos critérios de inclusão. Todos apresentavam quadro indicativo de síndrome gripal, composto de febre, tosse (produtiva ou não), dispneia etc.

Dos pacientes estudados, a maioria, 32 (56,2%), era do sexo masculino. A mediana da idade foi de 42 anos, variando de 21 a 68. As características clínicas e sociodemográficas dos pacientes estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1** – Características sociodemográficas dos 57 pacientes que vivem com HIV/aids, com quadro gripal, incluídos no estudo. Botucatu, 2022.

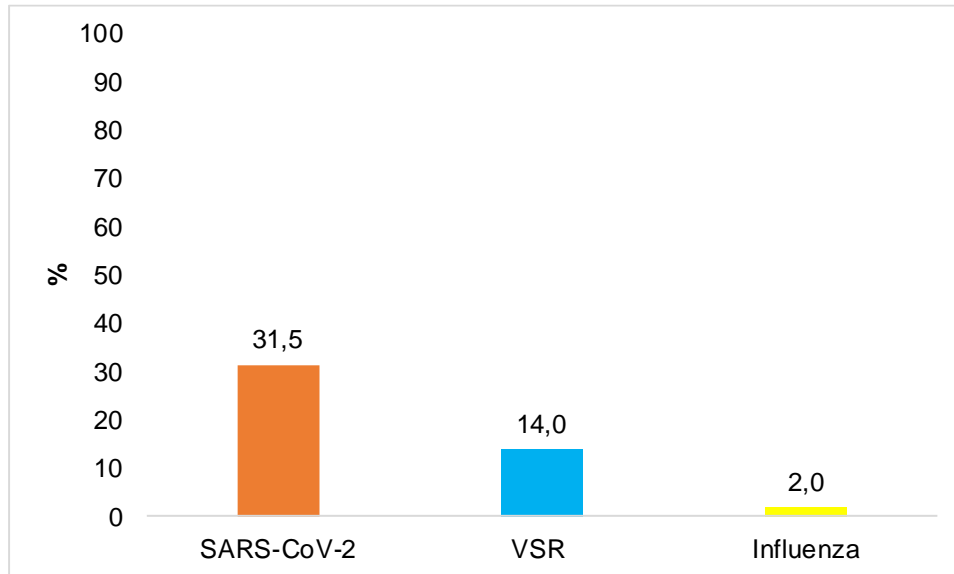
Variáveis	N	%
Mediana da idade (anos)	42	
Sexo masculino	32	(56,2)
Sexo feminino	25	(43,8)
Uso de álcool	09	(15,7)
Uso de tabaco	18	(31,5)
Uso de drogas ilícitas	09	(15,7)
*Detecção viral	36	(63,2)
**Detecção dos três vírus estudados	27	(47,5)

\* Detecção viral: diferentes vírus do painel

\*\* Detecção de SARS-CoV-2, influenza e vírus sincicial respiratório

Em 36 (63,2%) pacientes houve detecção de algum vírus do painel de patógenos e em 21 (36,8%) não foram identificados quaisquer patógenos.

Nota-se, portanto, que na casuística estudada, composta somente de pessoas que vivem com HIV/aids que se apresentavam com quadro gripal, houve maior ocorrência do SARS-CoV-2 (31,5%), seguido do VSR (14,0%). O vírus influenza encontrado em apenas um (2,0%) paciente, foi do subtipo H3N2, como visto no gráfico 1.



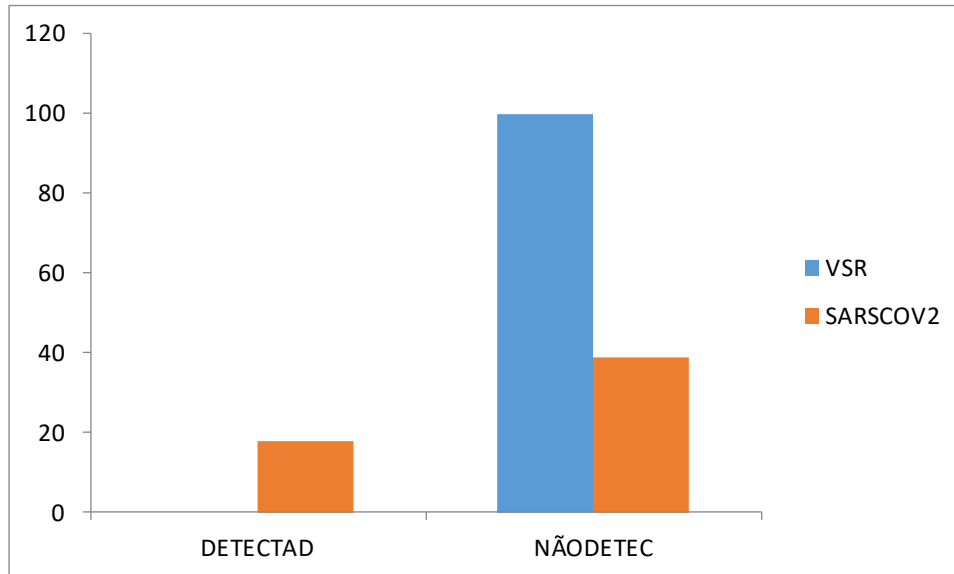
**Gráfico 1** - Ocorrência de infecções causadas pelos vírus SARS-CoV-2, vírus sincicial respiratório (VSR) e influenza, em 57 pacientes que vivem com HIV/aids, com quadro gripal, incluídos no estudo. Botucatu, 2022.

Durante a realização do estudo, três pacientes evoluíram a óbito em função de complicações e/ou comorbidades presentes: tabagismo, doença pulmonar obstrutiva crônica, quadro neurológico progressivo e tuberculose em tratamento. Esses pacientes estavam em esquema de TARV com carga viral plasmática do HIV indetectável e contagens de células T CD4+ acima de 350/mm<sup>3</sup>.

Os três pacientes que evoluíram a óbito apresentaram quadro respiratório com piora progressiva, com necessidade de suporte ventilatório em todos eles. Apesar de não terem sido detectados o SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios analisados no painel de patógenos, é importante lembrar que dada a situação clínica sugestiva de infecção viral, ela possa ter ocorrido por algum outro patógeno não identificado. Ressalta-se que não foi possível realização de necropsia dos pacientes.

A maior proporção de SARS-CoV-2 em comparação aos outros vírus, pode ser justificada pela condição pandêmica dessa infecção em todo mundo, incluindo a cidade de Botucatu.

Não houve associação entre a ocorrência de detectados e não detectados entre SARS-CoV-2 e VSR em PVHA ( $p = 0,085$ ), conforme mostrado no gráfico 2.



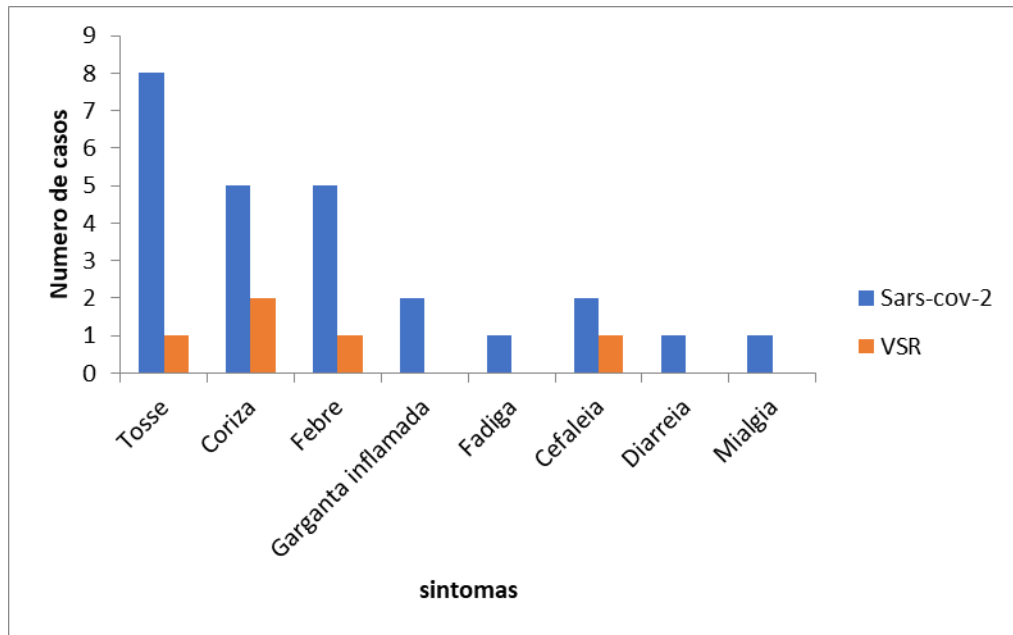
**Gráfico 2** – Associação entre a ocorrência de SARS-CoV-2 e VSR para detectados e não detectados. Botucatu, 2022.

Teste exato de Fisher ( $p = 0,085$ ).

Legenda: VSR - vírus sincicial respiratório; SAR-CoV-2 – corona vírus; Detectado e Não-detectado.

No entanto, é importante ressaltar a detecção de VSR em sete indivíduos com predomínio do tipo B, superando os casos de influenza. Esse resultado corrobora os últimos dados dos boletins epidemiológicos <sup>56,57</sup> publicados em 2022, indicando que o VSR é considerado o segundo principal causador de síndrome respiratória aguda grave no Brasil, estando atrás apenas do SARS-CoV-2.

A seguir, no gráfico 3, podem-se observar os principais sintomas encontrados no grupo de 27 pacientes que se apresentaram com quadro gripal, com detecção de SARS-CoV-2 e VSR.



**Gráfico 3** – Principais sintomas clínicos reportados pelos 27 pacientes que vivem com HIV/aids, com detecção dos vírus SARS-CoV-2 e sincicial respiratório, incluídos no estudo. Botucatu, 2022.

Não houve associação entre os sintomas presentes em pacientes detectados para SARS-CoV-2 e VSR ( $p = 0,8851$ ) nesse grupo de PVHA.

Dada a condição de pandemia e por se tratar de um grupo de risco, todos os indivíduos que apresentavam algum sintoma, único ou múltiplo, que correspondesse a quadros gripais, eram orientados a buscar atendimento e realizar testagens para diagnóstico de covid-19.

Considerando a heterogeneidade clínica da covid-19 em diferentes indivíduos, mesmo sadios e sem histórico de comorbidades, as PVHA amparam-se de sua condição de imunossupressão visando à vigilância e o controle de infecções respiratórias. A suspeita de uma provável infecção pelo SARS-CoV-2 facilitou o diagnóstico de outras infecções virais que cursam com quadros gripais ou resfriados comuns, que em outras épocas passariam despercebidas ou sem as devidas importâncias, clínica e epidemiológica <sup>30,39</sup>.

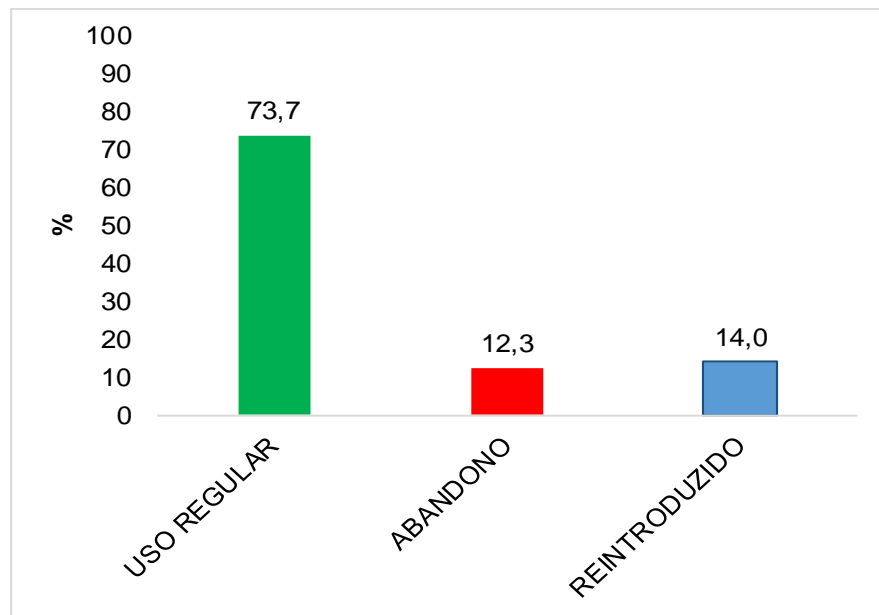
Observou-se a ocorrência das principais comorbidades presentes nos 27 pacientes nos quais foram detectados ambos os vírus: SARS-CoV-2 e VSR, conforme mostrado na tabela 2.

**Tabela 2** – Principais comorbidades reportados pelos 27 pacientes que vivem com HIV/aids, com detecção dos vírus SARS-COV-2 e sincicial respiratório (VSR), incluídos no estudo. Botucatu, 2022.

<b>Comorbidades</b>	<b>SARS-CoV-2</b>	<b>VSR</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
Diabetes	1 (5,5)	-
Obesidade	1 (5,5)	1 (1)
Hipertensão	1 (5,5)	-
Neoplasia	1 (5,5)	-

Alguns pacientes apresentaram histórico de comorbidades no grupo com detecção de SARS-CoV-2. Por outro lado, apenas um caso (14,3%) de infecção por VSR apresentou obesidade. Está claro que a covid-19 associa-se a uma gama maior de comorbidades que aumentam o risco de doença mais grave ou morte <sup>21,39</sup>. Logo, a infecção de SARS-CoV-2 entre PVHA com associação de comorbidades, tende a piorar o desfecho desse indivíduo <sup>39, 45</sup>.

Também foram avaliados o uso ou não de TARV neste grupo de 57 pacientes, no momento da inclusão no estudo, como podemos ver no gráfico 4.



**Gráfico 4** – Frequência de uso regular, abandono e reintrodução da terapia antirretroviral dos 57 pacientes que vivem com HIV/aids. Botucatu, 2022.

Dentre os 57 pacientes, 73,7% (42) estavam em uso regular da terapia antirretroviral, enquanto 2,0% (7) abandonaram o tratamento e, 14,0% (8) tiveram seu tratamento reintroduzido. É importante ressaltar o papel da TARV na redução e controle virológico adequado e, por conseguinte, a recuperação imune das PVHA <sup>45</sup>, além de diminuir a susceptibilidade a infecções oportunistas.

## 6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Houve problemas técnicos de padronização de testes, uma vez que o equipamento utilizado para realização das técnicas (*Hybrispot*) apresentou contaminação e, portanto, resultados divergentes, o que atrasou em alguns meses até resolução do problema. Além disso, a pequena casuística aqui estudada, não demonstra representatividade da população total de PVHA no Brasil.

## **7. CONCLUSÃO**

Foi possível determinar a alta ocorrência de infecções pelo SARS-CoV-2 e VSR em pessoas que vivem com HIV/aids, aqui estudadas, não havendo diferença nos sintomas referentes a cada uma das infecções.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Greene C WA. history of AIDS: Looking back to see a head. *Eur. J. Immunol.* Apr 2007; 37: S94–102.
- 2-UNAIDS. Estatísticas globais sobre hiv 2017. *Global Statistics*; 2018.
- 3-Ministério da Saúde (BR). Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, PN de DST e AIDS; 2018.
- 4-Camargo CC. Avaliação da adesão à terapia antirretroviral em indivíduos que vivem com HIV/AIDS [Tese doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista-UNESP; 2017.
- 5-Cliff IC. *Lab Med.* Diagnostic Flow Cytometry and the AIDS Pandemic. *Lab Med.* 2015; 46(3):59-64.
- 6-Netanya GS, Irini S. Can ART treatment reduce long-term complications by reducing inflammation? *Curr Opin HIV AIDS.* 2014 Jan; 9(1): 72–79.
- 7-Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez ML, Alegre M, Domingo JC, et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART- associated lipodystrophy. *Antivir Ther.* 2006;11(6):729-40.
- 8-Irini S, Shelly JK, Nittaya P, James LF, Bonnie S, Suteeraporn P, et al. Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection. *Clin Infect Dis.* 2017 Jan; 64(2): 124-131.
- 9-Linda N, Phyllis C, Tien MD. Metabolic Syndrome, Diabetes, and Cardiovascular Risk in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014 Sep; 11(3): 271–278.
- 10-Sackor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol.* 2002;8(2):115-21.
- 11-Mulligan K, Grunfeld C, Tai VW, Algren H, Pang M, Chernoff DN, et al. Hyperlipidemia and insulin resistance are induced by protease inhibitors independent of changes in body composition in patients with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000; 23: 35-43.
- 12-Amorosa V, Tebas P. Bone disease and HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(1):108.
- 13-Arshad A, Bansal A, Patel RC. Cardiac complications of human immunodeficiency virus infection: diagnostic and therapeutic considerations. *Heart Disease* 2000; 2; 133-45.
- 14-Barbaro G. Cardiovascular manifestations of HIV infection. *Circulation* 2002; 106: 1420-5.

- 15-Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, et al. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr; 197(8): 1133.
- 16-Casott JAS, Fatores Associados à Resposta Imunológica Paradoxal ao Tratamento Antirretroviral em Pacientes com AIDS em Ambulatórios de Doenças Infecciosas. [Tese mestrado]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo – UFES; 2010.
- 17-Colleen F, Kelley A, Christina MR, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar; 48(6): 787-794.
- 18-Ministério da Saúde (BR). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, PN de DST e AIDS; 2018.
- 19-DE LUGISNAN, WILLIAMS J. To monitor the COVID-19 pandemic we need better quality primary care. *Royal Academic*. 2020; 16(30).
- 20-GREENOUGH, A. Respiratory syncytial virus infection: clinical features, management, and prophylaxis. *Current opinion in pulmonary medicine*, v. 8, n. 3, p. 214-217, 2002.
- 21-GUDIPATI S, et al. Descriptive Analysis of Patients Living with HIV Affected by COVID-19. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020; 85:123-126.
- 22-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 14 de 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde, SVS. Sivep-Gripe. Brasília, DF. 2019
- 23-MINISTÉRIO DA SAÚDE. painel coronavírus - síntese de casos, óbitos, incidência e mortalidade. Brasília, DF. disponível em>:<https://coronavirus.saude.gov.br/><acesso em 20 mar. 2020.
- 24-PIMENTEL, A. et al. DIRETRIZES PARA O MANEJO DA INFECÇÃO CAUSADA PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)-2017. Sociedade Brasileira de Pediatria. 2017
- 25-SINGH M. et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV) —current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments, *Vet Q*. 2020; 40: 68-76.
- 26-SKOWRONSKI D. et al. Interim estimates of 2019/20 vaccine effectiveness during early-season co-circulation of influenza A and B viruses, Canada, February 2020. *Euro S*. 2020; 25(7).

- 27-PAULA J. et al. Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial - GAL: Avaliação de uma ferramenta para a vigilância sentinela de síndrome gripal, Brasil, 2011-2012. *Epidemiol. Serv.* 2017; 26(2).
- 28-FREITAS R; DONALÍSIO R. M. Excesso de Mortalidade em Adultos e Idosos e Circulação de Subtipos de Vírus da Gripe no Sul do Brasil. *Front Immunol.* 2018; 8 (1903).
- 29-UNAIDS. Estatísticas globais sobre HIV 2019. *Global Statistics*; 2019.
- 30-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, PN de DST e AIDS; 2019.
- 31-WHO. World Health Organization. Influenza (seasonal) fact sheet. 2018.
- 32-KLEIN M, Y.; DELBALSO L.; COTÉ S. G. Influenzavirus infection is a primary cause of febrile respiratory illness in hiv-infected adults, despite vaccination. *Clin Infect Dis.* 2007; 45 (2): 234-40.
- 33-GARBINO J. et al. Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection. *Clin Scien.*2008; 22(6): 701-705.
- 34-SÁNCHEZ MCM. et al. Respiratory Virus Infections in Children with Cancer or HIV Infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 28(3): 154-9.
- 35-IULIANO A. et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Scienc Direct.* 2018; 391 (1285-1300).
- 36-Boletim Epidemiológico - Semana Epidemiológica (SE) 11/2022. SIVEP SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA GRIPE. Fiocruz. Disponível em > Boletim InfoGripe - semana 15/2022 - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e tecnologia em saúde para a população brasileira<Acesso em abril, 2022.
- 37-SALVATORI G. et al. Managing COVID-19-Positive Maternal–Infant Dyads: An Italian Experience. 2020; 15(5).
- 38-RHEEM I.; PARK J.; KIM TH.; KIM J. W.Evaluation of a Multiplex Real-time PCR Assay for the Detection of Respiratory Viruses in Clinical Specimens. *Ann Lab Med.* 2012 Nov; 32 (6): 399-406.
- 39-ZHU F.; CAO Y.; XU S.; ZHOU M. Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV in a patient in Wuhan city, China. *J of Medical Virology.* March 2020.
- 40-Ministério da Saúde (BR). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, PN de DST e AIDS; 2021.
- 41-Mobius Life. Disponível em > PR24 FLOW CHIP [mobiuslife.com.br/pr24-flow-chip-2/](https://mobiuslife.com.br/pr24-flow-chip-2/)< Acesso em 3 Fev. 2022.

42-Biometrix. Disponível em >[www.biometrix.com.br/kit-de-extracao/biopur-dna/](http://www.biometrix.com.br/kit-de-extracao/biopur-dna/)< Acesso em 4 fev. 2020.

43-Boletim da Sociedade Brasileira de Pediatria; acessado em 03 set 2017; Disponível em: <http://www.spsp.org.br/site/asp/boletins/AT2-2.pdf> acesso em 27 Mar 2022.

44-Fiocruz. Disponível em >[portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos\\_2/resumo\\_infogripe\\_2022\\_11.pdf](http://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos_2/resumo_infogripe_2022_11.pdf)< acesso em 28 fev. 2022.

45-ANA CARLA PELEGO DA SILVA. INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE NO PACIENTE HIV POSITIVO: 2014

46-E. E. Walsh, "Infecção do vírus sincicial respiratório em adultos", Seminários em Medicina Respiratória e Crítica, vol. 32, nº 4, pp. 423-432, 2011.

47-LIPHAUS, Liphau Bernadete L. et al. O que você precisa saber sobre influenza? BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 19, n. 217, p. 1-10, 2022.

48-Souza TML, Salluh JIF, Bozza FA, Mesquita M, Soares M, Motta FC, *et al.* H1N1pdm Influenza Infection in Hospitalized Cancer Patients: Clinical Evolution and Viral Analysis. Fessler MB, editor. PLoS ONE [Internet]. 2010 Nov 30 [cited 2014 Apr

49-Ministério da Saúde. Protocolo de Tratamento de Influenza [Internet]. 2013 [cited 2014 Mar 29]. Available from: <http://www.slideshare.net/MinSaude/protocolo-de-tratamento-de-influenza>

50- Mor SM, Aminawung JA, Demaria A Jr, Naumova EN. Pneumonia and influenza hospitalization in HIV-positive seniors. *Epidemiol Infect.* 2011 Sep;139(9):1317–25.

51-Peters PJ, Skarbinski J, Louie JK, Jain S, New York City Department of Health Swine Flu Investigation Team, Roland M, *et al.* HIV-Infected Hospitalized Patients with 2009 Pandemic Influenza A (pH1N1)--United States, Spring and Summer 2009. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2011 Jan 1.

52-Sheth AN, Althoff KN, Brooks JT. Influenza Susceptibility, Severity, and Shedding in HIV-Infected Adults: A Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2011 Jan 15 [cited 2014 Mar 29];52(2):219–27. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/ciq110>

53-FINE A. D. et al. Influenza A among patients with human immunodeficiency virus: an outbreak of infection at a residential facility in New York City. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(12): 1784-91.

54-SILVA, Ana Carla Pecego da et al. Infecção respiratória aguda grave no paciente HIV positivo aspectos clínicos e epidemiológicos. 2014. Tese de Doutorado.

55-Mobius Life. Disponível em ><https://mobiuslife.com.br/pr24-flow-chip-2/>< Acesso em mar 2022.

56- Secretaria da Saúde. Orientações para coleta e transporte de secreção respiratória. Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Laboratório Central de Saúde Pública- LACEN/RS, 2020. Disponível em ><https://atencaobasica.saude.rs.gov.br>< Acesso em nov 2020.

## APÊNDICE 1

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

BIOPUR KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN VÍRUS DNA/RNA 2.0  
(Adaptado pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada – LBA)

#### Preparo dos Tampões/verificações

- 1) Verificar se foi adicionado 28 mL de Etanol PA no tampão de Lavagem 1 (O frasco vem com 28 mL de tampão de lavagem 1).
- 2) Verificar se foi adicionado 84 mL de Etanol PA no tampão de Lavagem 2 (O frasco vem com 36 mL de tampão de lavagem 2).

#### Preparo do Carrier (Carreador de RNA)

- 1) Adicionar 1.0 mL de **tampão de eluição** (que vem no kit de extração) no tudo de Carreador de RNA e homogeneizar vigorosamente.
- 2) Aliquotar 15 µL do carreador diluído em tubos de 1.5 mL, acondicionar em caixa/soroteca e armazenar a -20°C.

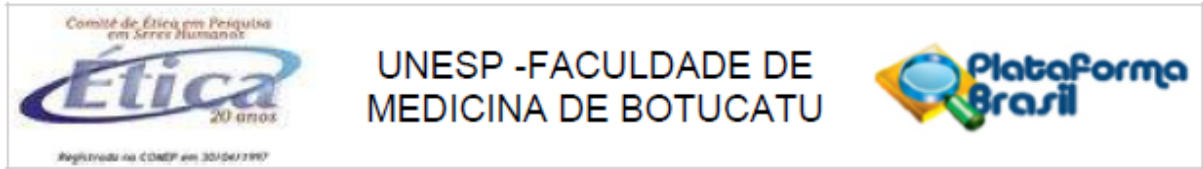
#### Extração de DNA/RNA

- 1) Adicionar 200 µL de Tampão de Lise VL e 50 µL de Proteinase K em um tubo contendo previamente 15 µL de carreador de RNA.
- 2) Adicionar 200 µL de amostra (amostra de *swab*), homogeneizar vigorosamente e incubar a 65° C por 10 minutos.
- 3) Centrifugar (spin) rapidamente para remover as gotículas da tampa do tubo.
- 4) Adicionar 280 µL de etanol PA e misturar por inversão rapidamente.
- 5) **CRÍTICO:** Centrifugar (spin) rapidamente para remover as gotículas da tampa do tubo. Obs. essa centrifugação deve ser muito rápida, geralmente 1 a 2 segundos.
- 6) Transferir todo o volume para uma coluna, centrifugar 5.000g x 1 min. e descartar o filtrado.
- 7) Adicionar 500 µL de **Tampão de Lavagem 1**, centrifugar 5.000g x 1 min. e descartar o filtrado.
- 8) Adicionar 500 µL de **Tampão de Lavagem 2**, centrifugar 5.000g x 1 min. e descartar o filtrado.
- 9) Adicionar novamente 500 µL de **Tampão de Lavagem 2**, centrifugar 14.000g x 3 min. E descartar o filtrado.
- 10) Transferir a coluna para um tubo de 1.5 mL e manter a coluna com a tampa aberta para evaporar qualquer resíduo de álcool.
- 11) Adicionar no centro da coluna 60 µL de água livre de DNase/RNase e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Por fim, centrifugar a 5.000g x 1 min. e descartar a coluna. O DNA/RNA pode ser utilizado imediatamente ou estocado a -20°C.

#### PCR - XGEN MULTI PR-24 FLOW CHIP

- 1) Separar dois tubos por amostra, um transparente e outro amarelo. (a reação ocorre em dois tubos de PCR por amostra).
- 2) Adicionar em cada tubo 25 µL de água livre de DNase/RNase e em seguida 5µL do DNA/RNA extraído. Não é necessário homogeneizar.

## ANEXO 1

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** COVID-19 E ALÉM ESTABELECIMENTO DE UM OBSERVATÓRIO DE SINAIS PRECOSES DE DOENÇAS POTENCIALMENTE PANDÊMICAS E EMERGÊNCIAS DE SAÚDE PÚBLICA DE RELEVÂNCIA

INTERNACIONAL

**Pesquisador:** Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 39858420.3.0000.5411

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

**Patrocinador Principal:** JBS S/A

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.538.561

**Apresentação do Projeto:**

A proposta é constituída por dois Eixos. Proposta de uma abordagem da COVID-19 baseada em dois eixos de vigilância. No primeiro, propõe-se a criação de duas estruturas para vigilância avançada mundial de doenças de potencial pandêmico, baseadas na mineração de dados em internet e redes sociais, além de sites governamentais, bases de artigos científicos indexados e preprint e listas de discussão de especialistas (ex.: ProMED). O objetivo dessa proposta é detectar, amplificar e avaliar consistência de sinais ultra precoces de alterações na epidemiologia de doenças infecciosas (ex.: comentários em redes sociais, busca por medicamentos na rede de computadores, notícias de jornais, entre outros). A metodologia é baseada em data mining aplicada continuamente a grandes bases de dados (big data), seguida por construção de simulações computacionais de evolução temporal e espacial. O eixo será constituído de seguimento contínuo de diversas coortes (Profissionais da saúde envolvidos ou não envolvidos em atendimento a pacientes com COVID-19 e/ou outras síndromes gripais; Pessoas vivendo com HIV/AIDS; Pacientes com pneumopatias; Pacientes com insuficiência cardíaca congestiva; Pacientes renais crônicos; pacientes reumatológicos com e sem uso de

antimaláricos) totalizando cerca de 4.000 sujeitos. Estes serão semanalmente abordados para a ocorrência de sintomas gripais e, em caso positivo, submetidos a painel diagnóstico molecular para diversos vírus respiratórios (entre eles coronavírus, influenza vírus, vírus sincicial respiratório, rinovírus, adenovírus etc.). Uma vez identificados vírus de relevância clínico-epidemiológica, proceder-se-á o sequenciamento genômico total, com avaliação de mutações por processos de bioinformática. Os dois eixos do projeto propõem um diálogo contínuo com as autoridades de saúde pública em níveis de Estado, país e mesmo internacionais.

Situação do Parecer

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 12 de Fevereiro de 2021

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
**(Coordenador(a))**