

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Eva Maria de Assis Carvalho

**Padronização e validação de técnica de qPCR para detecção dos HPVs de alto
risco 16 e 18 em pacientes com doença inflamatória intestinal**

Juiz de Fora
2025

Eva Maria de Assis Carvalho

Padronização e validação de técnica de qPCR para detecção dos HPVs de alto risco 16 e 18 em pacientes com doença inflamatória intestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área: Imunologia e doenças Infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Eva Maria de Assis.

Padronização e validação de técnica de qPCR para detecção dos HPVs de alto risco 16 e 18 em pacientes com doença inflamatória intestinal / Eva Maria de Assis Carvalho. -- 2025.

129 f. : il.

Orientador: Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. HPV. 2. PCR em tempo real. 3. Doença inflamatória intestinal. I. Watanabe, Aripuanã Sakurada Aranha, orient. II. Título.

Eva Maria de Assis Carvalho

Padronização e validação de técnica de qPCR para detecção dos HPVs de alto risco 16 e 18 em pacientes com doença inflamatória intestinal

Dissertação apresentada ao Programa da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia & Doenças infectoparasitárias.

Aprovada em 25 de abril de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Vania Lúcia da Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Emerson Carraro

Universidade Estadual do Centro-Oeste

Juiz de Fora, 08/04/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Aripuana Sakurada Aranha Watanabe, Professor(a)**, em 28/04/2025, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vania Lucia da Silva, Professor(a)**, em 06/05/2025, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emerson Carraro, Usuário Externo**, em 06/05/2025, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.ufff.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2340088** e o código CRC **D69DE9D5**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e iluminar meu caminho nessa jornada.

Ao meu marido, Matheus, pelo apoio incondicional, por estar ao meu lado em cada passo dessa jornada, pela paciência e companheirismo e por ser minha felicidade nos dias difíceis.

Aos meus pais, Bernadete e Néio, por me criarem com valores sólidos, pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Eu não teria alcançado essa conquista se não fosse por vocês.

Aos meus irmãos, Diego e Lucas, pelo companheirismo, suporte e incentivo.

Agradeço à minha querida avó, Mirza, por tudo que fez por mim. Não há palavras que possam expressar minha gratidão.

Ao meu orientador, Ari, pela oportunidade, pelo apoio, dedicação e paciência. Obrigada por confiar em mim, por todos os ensinamentos valiosos e por estar sempre presente.

À amiga Kátia, pelos ensinamentos, apoio e pelas conversas descontraídas que tornam os dias mais leves.

À Cris, Lorena e Thaís pela oportunidade de fazer parte dessa pesquisa tão importante.

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde pelo auxílio financeiro para que a realização desse projeto fosse possível.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação.

RESUMO

Os papilomavírus humanos (*Human papillomaviruses*-HPVs) são vírus de DNA dupla fita que apresentam grande diversidade genética e causam infecções de pele e mucosa. Alguns tipos do vírus estão ligados a diversos tipos de câncer, como o de colo de útero e do canal anal, sendo os tipos 16 e 18 os mais comuns. Porém, dados sobre prevalência da infecção anal por HPV são escassos, e são ainda mais escassos dados sobre a infecção anal em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), como a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Essa população pode estar em risco por conta da inflamação constante, resposta imune atípica e a frequente utilização de medicamentos imunossupressores, conhecidamente associados ao surgimento de neoplasias. O que evidencia a importância da detecção do HPV nessa população. A infecção por HPV pode ocorrer mesmo que não haja lesões detectáveis, sendo as técnicas moleculares como a PCR muito úteis na identificação do patógeno e diferenciação de seus tipos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é padronizar uma reação de PCR quantitativa (qPCR) para detecção de HPV 16 e 18, e validar o protocolo em amostras clínicas de pacientes que apresentam DII. Para a padronização, foram testadas variações na concentração dos primers e das sondas, condições da ciclagem térmica, bem como outros parâmetros da reação de qPCR, além de testes *in silico* dos primers e sondas. Foram utilizadas amostras sabidamente positivas e quantificadas para os tipos 16 e 18 do HPV para construção de uma curva padrão de concentração, a fim de avaliar parâmetros relacionados à performance do ensaio, como a eficiência, sensibilidade e linearidade da reação. Foram testados diferentes kits de extração de DNA comerciais visando selecionar o mais adequado para as amostras utilizadas. Para tanto, o material genético extraído de duas amostras foi quantificado e sua pureza foi avaliada. Após padronizada a reação, foram utilizadas amostras coletadas de 183 pacientes, 133 com DII e 50 pacientes saudáveis (grupo controle) para validação. O melhor resultado na extração do DNA foi obtido com a utilização do kit Qiaamp DNA blood mini kit (Qiagen). Os testes de especificidade mostraram que os primers são específicos para ambos os tipos testados. A sensibilidade da reação para detecção do HPV 16 e do HPV 18 é de até 10 cópias/ μ L. A eficiência e o r^2 calculados para a reação de detecção do HPV 16 foi de

92,032 e 0,985, respectivamente. Para a reação de detecção do HPV 18, a eficiência foi de 93,055 e o r^2 foi de 0,986. Das 183 amostras utilizadas, 9 foram positivas para algum tipo de HPV, sendo 2 do grupo controle e 7 do grupo com DII. Entretanto a diferença entre os dois grupos não foi significativa ($p>0,05$). Por fim, deve-se ressaltar que é importante gerar mais dados sobre a infecção por HPV nessa população, para que possam ser elaboradas melhores medidas profiláticas e diretrizes de saúde voltadas para essa população.

Palavras-chave: HPV; PCR em tempo real; doença inflamatória intestinal.

ABSTRACT

The Human papillomaviruses (HPVs) are double-stranded DNA viruses with great genetic diversity cause skin and mucous membrane infections. Some of the virus' types are linked to several forms of cancer, such as cervical and anal cancers, with the types 16 and 18 being the most common. However, data on the prevalence of anal HPV infection are scarce, and data on anal infection in patients with inflammatory bowel disease (IBD), such as Crohn's disease and ulcerative colitis, are even scarcer. This population may be at special risk due to constant inflammation, atypical immune response, and frequent use of immunosuppressive drugs, which are known to be associated with the development of neoplasia. This highlights the importance of detecting HPV in this population. HPV infection can occur even in the absence of detectable lesions, and molecular techniques such as PCR are remarkably useful in identifying the pathogen and differentiating its types. Therefore, the objective of this study is to standardize a quantitative PCR (qPCR) reaction for the detection of HPV 16 and 18, and to validate the protocol in clinical samples from patients with IBD. For standardization, variations in the concentration of primers and probes, thermal cycling conditions, as well as other qPCR parameters were tested, in addition to *in silico* tests of the primers and probes. Quantified samples known to be positive for HPV types 16 and 18 were used to construct a standard concentration curve in order to evaluate parameters related to the performance of the assay, such as the efficiency, sensitivity and linearity of the reaction. Different commercial DNA extraction kits were tested in order to select the most suitable one for the samples used. To this end, the genetic material extracted from two samples was quantified and assessed for its purity. After the reaction was standardized, samples collected from 183 patients, 133 with IBD and 50 healthy patients (control group) were used for validation. The best DNA extraction result was achieved using the Qiaamp DNA blood mini kit (Quiagen). Specificity tests showed that the primers were specific for both the types tested. The sensitivity of the reaction for detecting HPV 16 and 18 is up to 10 copies/ μ L. The efficiency and r^2 calculated for the HPV 16 detection reaction were 92.032 and 0.985, respectively. For the HPV 18 detection reaction, the efficiency was 93.055 and the r^2 was 0.986. Of the 183 samples used, 9 were positive for some type of HPV, 2 from the control

group and 7 from the IBD group. However, the difference between the two groups was not significant ($p>0.05$). Finally, it should be emphasized that it is important to generate more data on HPV infection in patients with IBD, so that better prophylactic measures and health guidelines can be developed for this population.

Keywords: HPV; real-time PCR; inflammatory bowel disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação do genoma do HPV 16 e a função desempenhada por cada um dos genes na infecção.....	18
Figura 2	– Ciclo de vida do HPV e genes expressos em cada etapa da replicação viral.....	22
Figura 3	– Progressão da infecção pelo HPV ao longo do tempo, desde o início da infecção até a eliminação ou persistência viral.....	28
Figura 4	– Sequência de acontecimentos que precedem a transformação celular, após o estabelecimento de infecção persistente por HPV.....	29
Figura 5	Representação da progressão da infecção pelo HPV no epitélio escamoso, desde o epitélio sem alterações até o câncer invasivo.....	31
Figura 6	– Fórmula utilizada para o cálculo do número de cópias/ μ L.....	44
Figura 7	– Equação da reta utilizada para calcular a carga viral das amostras....	47
Figura 8	– Alinhamento das sequências de oligonucleotídeos.....	52
Figura 9	– Cálculo do número de cópias/ μ L do controle positivo do HPV 16.....	53
Figura 10	– Cálculo do número de cópias/ μ L do controle positivo do HPV 18.....	53
Figura 11	– Teste de sensibilidade HPV 16.....	54
Figura 12	– Teste de sensibilidade HPV 16 utilizando o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega).....	57
Figura 13	– Curva padrão construída para o HPV 16 contendo 5 pontos em triplicata.....	57
Figura 14	– Teste de sensibilidade HPV 18.....	58
Figura 15	– Curva padrão construída para o HPV 18 contendo 6 pontos em triplicata.....	59
Figura 16	– Positivos e negativos para HPV 16 e 18 com relação ao sexo.....	60
Figura 17	– Média e desvio padrão do número de cópias por reação dos positivos para HPV 16 e 18.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Sequências sintetizadas comercialmente para utilização como controle positivo do HPV 16 e 18, comprimento das sequências e vetor utilizado para clonagem.....	44
Tabela 2	– Sequências dos primers e sonda utilizados na reação de amplificação do gene da β -globina.....	47
Tabela 3	– Sequências dos primers e sondas escolhidos para HPV 16 e 18.....	49
Tabela 4	– Comprimento, conteúdo GC, temperatura de melting e análise de formação de estruturas secundárias dos primers e sondas dos HPVs 16 e 18.....	50
Tabela 5	– Novos primers e sonda para o HPV 16.....	51
Tabela 6	– Comparação da concentração (em ng/ml) e pureza do material extraído através de diferentes kits de extração utilizando-se duas amostras clínicas.....	52
Tabela 7	– Concentrações dos primers e sondas testadas nas diluições 107 e 104 e os respectivos valores de C_q obtidos.....	56
Tabela 8	– Frequência de amostras positivas no grupo controle e no grupo DII, quais os tipos encontrados e número de coinfeções.....	60
Tabela 9	– Média, mediana e o desvio padrão da quantidade de cópias por reação dos positivos para HPV 16 e 18.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Célula Treg	Célula T regulatória
DII	Doença inflamatória intestinal
DC	Doença de Crohn
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau (<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IFN	Interferon
IL	Interleucina
JEC	Junções escamocolunares
LCR	Região de controle longo (<i>Long Control Region</i>)
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau (<i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
NF-κB	Fator nuclear-κB (<i>Nuclear factor-κB</i>)
NIA	Neoplasia intraepitelial anal
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Exterminadora natural (<i>Natural Killer</i>)
NKT	Exterminadora natural T (<i>Natural Killer T</i>)
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frames</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PV	Papilomavírus
pRb	Proteína do retinoblastoma
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
POP	Procedimento operacional padrão
RCU	Retocolite ulcerativa
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato gastrointestinal

TLR	Receptor tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
VLP	Partículas semelhantes a vírus (<i>virus-like particle</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
nm	Nanometro
pb	Pares de bases
μL	Microlitro
[c]	Concentração
ng	Nanograma
Da	Dalton
C _q	Ciclo de quantificação (<i>quantification cycle</i>)
ΔG	Valor de energia livre de Gibbs
E	Eficiência da reação
r ²	Coeficiente de correlação
mM	Milimolar
μM	Micromolar
p	Probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Classificação taxonômica.....	17
1.2	Características do vírus.....	17
1.3	Replicação viral.....	20
1.4	Epidemiologia.....	23
1.5	Patogênese.....	23
1.6	Oncogênese.....	28
1.7	Doença inflamatória intestinal (DII)	32
1.8	Vacinas contra o HPV.....	35
1.9	Diagnóstico de HPV.....	36
1.10	Justificativa.....	39
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	População.....	41
3.2	Coleta, manuseio e preparação das amostras.....	42
3.3	Extração do DNA.....	42
3.4	Controle positivo.....	43
3.5	Reação de qPCR.....	45
3.6	Construção de curva padrão e análise da performance do ensaio.....	45
3.7	Especificidade.....	46
3.8	Validação e cálculo da carga viral.....	47
3.9	Análise estatística.....	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Análise <i>in silico</i> dos primers e sondas.....	49
4.2	Definição do protocolo de extração.....	51
4.3	Testes de especificidade.....	52
4.4	Padronização da qPCR.....	53

4.5	Validação e carga viral.....	59
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFRÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A - Procedimento operacional padrão relativo à coleta, transporte e armazenamento das amostras clínicas.....	81
	APÊNDICE B – Artigo submetido – Respiratory Viruses’ circulation during pandemic: why is rhinovirus so “tough guy”?.....	82
	APÊNDICE C – Trabalho premiado e resumo publicado em anais do XVI Congresso Médico Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora – COVID longa e suas implicações neurológicas.....	109
	APÊNDICE D – Artigo submetido – Ocorrência de Rinovírus Humano e Vírus Sincicial Respiratório em Amostras Negativas para SARS-CoV-2 (2020-2021) em Juiz de Fora e Região: Um Estudo Transversal.....	110

1 INTRODUÇÃO

A família *Papillomaviridae* é uma família muito diversa de vírus de DNA, que infectam células epiteliais de diversos vertebrados. Dentro da família existem duas subfamílias, nas quais estão incluídos mais de 50 gêneros e mais de 130 espécies. Os Papilomavírus (PVs) são capazes de infectar, além dos seres humanos, uma ampla variedade de animais, incluindo outros mamíferos, como primatas não humanos, coelhos e gatos, além de répteis, aves e peixes (VAN DOORSLAER *et al.*, 2018). Os PVs dos gêneros *Etapapillomavirus*, *Iotapapillomavirus*, *gammapapillomavirus* e *Kappapapillomavirus*, por exemplo, infectam aves, roedores, humanos e coelhos, respectivamente. Porém, apesar da variedade de hospedeiros, são altamente espécie-específicos, não sendo comum que um mesmo tipo acometa diferentes espécies (VILLIERS *et al.*, 2004).

Os Papilomavírus Humanos (*Human papillomaviruses*-HPVs) são vírus que infectam as células da pele e mucosas dos seres humanos. O vírus possui distribuição global e é considerado a infecção sexualmente transmissível mais frequente no mundo e a infecção viral com maior prevalência no sistema reprodutivo (CDC, 2022; OPAS, 2023). Já existem mais de 200 tipos de HPV listados pelo *International Human Papillomavirus Reference Center* (IHRC, 2023) sendo alguns destes associados a lesões benignas e malignas em região de pele e mucosas (LETO *et al.*, 2011; GHEIT, 2019). A maior parte das pessoas entra em contato com o HPV em algum momento da vida, mas a tendência é de que o vírus seja eliminado pela ação do sistema imune. Porém, quando ocorre persistência, podem causar desde tumores benignos até câncer (CDC, 2022). Alguns tipos de HPVs estão associados ao desenvolvimento de câncer de colo de útero e quase 100% dos casos podem ser atribuídos à infecção. A relação entre a infecção pelo HPV e o câncer foi feita na década de 70 pelo pesquisador alemão Harald Zur Hausen (1977) e hoje sabe-se que, além do câncer cervical, os HPVs também estão associados com casos de câncer em outras regiões (KRZOWSKA-FIRYCH *et al.*, 2019; LEBRETON *et al.*, 2020; THOMAS *et al.*, 2021).

1.1 Classificação taxonômica

Os HPVs apresentam grande diversidade genética e estão distribuídos em cinco gêneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*, sendo a maioria dos HPVs conhecidos incluídos no gênero *Gammapapillomavirus*, seguido pelo gênero *Alphapapillomavirus* (VILLIERS *et al.*, 2004; IHRC, 2023). A nomenclatura dos HPVs é definida pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), a nível de espécie e taxa superiores. Porém, um novo tipo de HPV é definido pelo *International Human Papillomavirus Reference Center* (IHRC) onde é designado por um número exclusivo após ter seu genoma sequenciado (VILLIERS *et al.*, 2004; BZHALAVA; EKLUND; DILLNER, 2015). Atualmente, o gênero *gammapapillomavirus* conta com 27 espécies e mais de 100 tipos, enquanto o gênero *alphapapillomavirus* possui 14 espécies e 65 tipos, e novos tipos de HPV continuam sendo descobertos (IHRC, 2023; ICTV, 2024).

A classificação taxonômica se dá através da comparação entre sequências nucleotídicas da fase aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) L1. Para serem classificados como gêneros distintos, devem possuir mais de 40% de diferença em suas sequências. Já espécies distintas dentro do mesmo gênero compartilham entre 60 e 70% da sequência nucleotídica e um tipo é considerado novo se houver diferença de mais de 10% na sequência do gene L1 em relação ao tipo mais próximo conhecido (VILLIERS *et al.*, 2004). De acordo com a classificação atual, os tipos de HPVs 16 e 18, os de alto risco oncogênico mais comuns, se encontram no gênero Alpha, nas espécies 9 e 7, respectivamente (IHRC, 2023). Os gêneros *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu* incluem os HPVs que causam infecção cutânea.

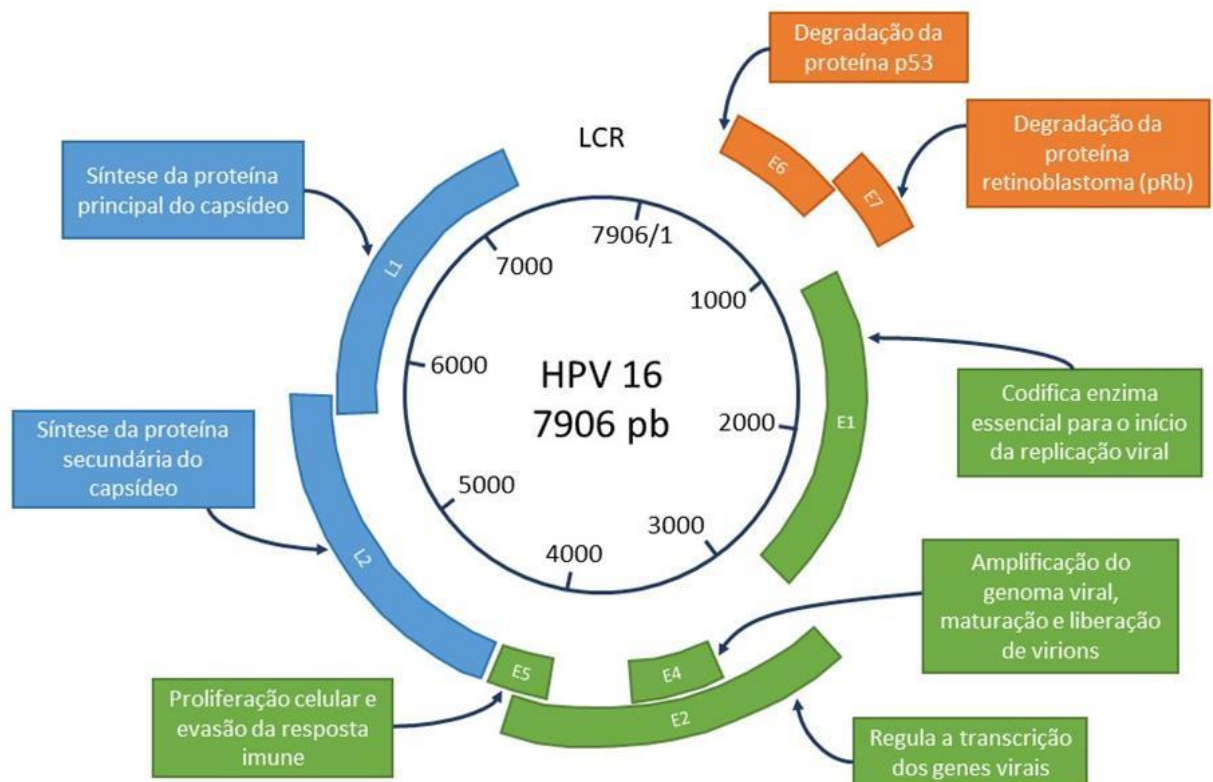
1.2 Características do vírus

Os HPVs são vírus pequenos, com cerca de 55nm, que possuem uma molécula de DNA circular, dupla fita, combinado com histonas. O material genético é envolto por um capsídeo de simetria icosaédrica, formado por 72 capsômeros da proteína L1, principal proteína que o compõe, além de aproximadamente 12 moléculas da proteína

L2. São vírus não envelopados, e seu genoma possui aproximadamente 8 mil pares de bases (VAN DOORSLAER *et al.*, 2018).

O genoma dos HPVs, no geral, é composto por 8 genes, localizados em 3 regiões denominadas *Early*, *Late* e *Long Control Region* (LCR - Região de controle longo) (figura 1).

Figura 1 - Representação do genoma do HPV 16 e a função desempenhada por cada um dos genes na infecção



Fonte: Adaptado de Gheit (2019).

Essa divisão em regiões precoce (*Early*) e tardia (*Late*) se deve ao padrão temporal e espacial da expressão dos genes do HPV ao longo do ciclo de vida do vírus, acompanhando a diferenciação celular da célula hospedeira (WANG; RODEN, 2013). A região LCR, localizada entre os ORFs L1 e E6, não codifica nenhuma proteína e está relacionada com a regulação da expressão gênica e da replicação viral. A região *Early* contém os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. O gene E1 codifica a única proteína que possui atividade enzimática do HPV. É uma proteína hexamérica, que desempenha papel de

helicase do DNA dependente de ATP e é essencial para o início da replicação viral e aumento do número de cópias do material genético do vírus dentro do núcleo das células, já que é responsável pela abertura da molécula de DNA e recrutamento da DNA polimerase do hospedeiro, dando início à replicação (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; UniProt consortium, 2025a). Essa proteína interage com a proteína E2, aumentando a especificidade de sua ligação ao DNA (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; UniProt consortium, 2025a). Sendo assim, a proteína codificada pelo gene E2 também tem importante papel na replicação viral. Também está relacionada com a regulação da transcrição do DNA viral, através da ligação da proteína ao *enhancer* (ou acentuador) E2R2, localizado nas regiões regulatórias do genoma (UniProt consortium, 2025b). Além disso, a proteína E2 tem importante papel na distribuição do genoma viral entre as células filhas durante a divisão (GHEIT, 2019). A proteína E2 também regula negativamente a expressão dos genes E6 e E7, através da ligação da proteína ao promotor p97 (GALLO *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ-HOYA; SOTO-CRUZ, 2021).

A proteína codificada pelo gene E4 é expressa nas camadas superiores do epitélio, um padrão de expressão similar às proteínas *Late*. Possui importante papel na amplificação do genoma viral em células já diferenciadas, participa da maturação das partículas virais e facilita a liberação dos vírions das células na fase mais tardia do ciclo infeccioso, através da diminuição da integridade do queratinócito e indução de apoptose das células. Essa proteína é formada a partir de *splicing* de sequências de mRNA de E1 com o ORF E4, formando a proteína E1^{E4} (BURD, 2003; DOORBAR, 2013; UniProt consortium, 2025c). A proteína E5 está relacionada com a proliferação celular e evasão da resposta imune do hospedeiro, já que impede que o MHC de classe I seja transportado para a superfície da célula, inibindo o reconhecimento pelas células T citotóxicas. Além disso, também contribui para a transformação celular (DIMAIO; PETTI, 2013; UniProt consortium, 2025d), sendo, então, a região E5 considerada um oncogene. Essa proteína também promove metástases e inibe a apoptose das células. O ORF E5 não está presente nos *Betapapillomavirus* (GHEIT, 2019).

As proteínas E6 e E7, nos HPVs de alto risco oncogênico 16 e 18, estão associadas à transformação celular e à malignização de lesões. A proteína E6 é uma

oncoproteína viral que tem como alvo a proteína supressora de tumor p53, degradando-a. Já a proteína E7 é responsável pela degradação da proteína do retinoblastoma (pRb), proteína supressora de tumor responsável pela regulação do ciclo celular (UniProt consortium, 2025e). Promovem, então, a desregulação do ciclo celular e inibem a apoptose. Além disso, a proteína E6 tem importante papel na manutenção do número de cópias episomais nos estágios iniciais da replicação viral (GRAHAM, 2017).

Já a região *Late*, contém os genes L1 e L2, que são expressos tardiamente no ciclo da infecção e codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo viral. A L1 é a principal proteína do capsídeo e é através da sua ligação com proteoglicanos de heparan sulfato, localizados na superfície celular e na matriz extracelular, que se inicia o processo de entrada do vírus na célula (PAPPA *et al.*, 2018). Já a proteína L2 é uma proteína secundária que desempenha importante papel na montagem dos vírions (WANG; RODEN, 2013). Além disso, tem como função o transporte do genoma viral até o núcleo (GHEIT, 2019).

1.3 Replicação viral

O início da infecção se dá quando a proteína L1, principal componente do capsídeo, se liga a proteoglicanos de heparan sulfato da superfície celular ou da matriz extracelular, levando a mudanças conformacionais no capsídeo, o que expõe a região N-terminal da proteína L2. Posteriormente, essa região N-terminal da proteína é clivada pela enzima furina, em um sítio de clivagem de furina conservado, facilitando a ligação da proteína a um outro receptor celular e posterior entrada na célula (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009; GHEIT, 2019). Não se sabe qual é esse receptor secundário, mas evidências apontam para alfa-6 integrina, receptores do fator de crescimento epidérmico e lamininas, por exemplo, variando de acordo com o tipo de HPV (EVANDER *et al.*, 1997; GRAHAM, 2017; GHEIT, 2019). Dependendo do tipo de HPV, a entrada na célula se dá através de endocitose dependente de actina, claritina ou caveolina. A endocitose do HPV 16, por exemplo, é independente de claritina e caveolina (SAPP; BIENKOWSKA-HABA, 2009; GHEIT, 2019).

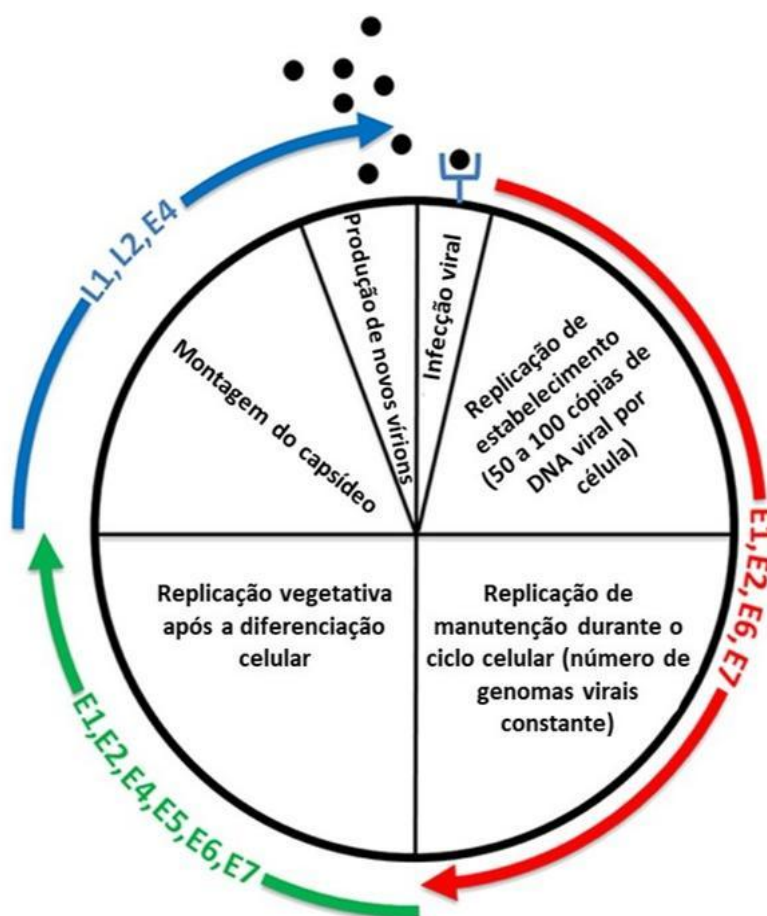
O vírion é transportado em direção ao núcleo da célula no interior de um endossomo inicial. Após a maturação, o endossomo inicial se torna um endossomo tardio, caracterizado por um pH ácido, onde ocorre o desnudamento da partícula viral, com a separação das proteínas L1 e L2. A proteína L1 é degradada e o complexo L2-DNA viral é entregue ao núcleo da célula no início da mitose, sendo o genoma viral entregue especificamente no domínio nuclear ND10 (GHEIT, 2019). O domínio nuclear ND10 consiste em um local onde proteínas positivamente reguladas por interferons se acumulam e tem função de proteção contra infecções virais. No contexto da infecção por HPV, a proteína viral L2 promove alterações nos componentes desse domínio que impedem a ação desse mecanismo de defesa, fazendo com que o vírus seja capaz de se replicar (MAUL, 1998; GHEIT, 2019).

A amplificação do genoma viral tem início com a ativação do promotor na região LCR o que inicia a expressão dos genes *Early*. As proteínas E1 e E2 se ligam à origem de replicação, localizada na região LCR. A proteína E2 tem um papel auxiliar para o início da replicação e garante que a ligação do domínio helicase da E1 não ocorra de forma inespecífica. Ocorre, então, a abertura da dupla fita e o recrutamento de enzimas do hospedeiro para iniciar o processo de replicação (KADAJA *et al.*, 2009). Após a amplificação inicial, o DNA viral é mantido com um número de cópias constante nas células basais, onde, a cada divisão celular, o material genético episossomal é dividido de forma semelhante nas células filhas (figura 2). Essa manutenção de um número constante de cópias é desempenhada por proteínas criadas a partir de splicing (E8^{E2C}), que tem papel repressor da replicação. As proteínas E1, E2, E6 e E7 também são essenciais nesse processo (KADAJA *et al.*, 2009; GHEIT, 2019). A manutenção constante dos episossomos nas células basais pode resultar em infecção persistente (GHEIT, 2019).

À medida que as células basais do epitélio se diferenciam em queratinócitos, ocorre replicação viral produtiva, chamada de replicação vegetativa (figura 2). Em uma

situação normal, quando as células deixam a camada basal e se diferenciam, elas param de se dividir. Porém, no contexto da infecção por HPV, o vírus precisa que as células estejam em divisão para utilizar de sua maquinaria para produção de cópias do genoma viral. Esse problema é resolvido com a expressão dos oncogenes E6 e E7, que tem como alvo as proteínas p53 e pRb, respectivamente, responsáveis pela regulação do ciclo celular, levando a célula a uma reentrada na fase S. A expressão dos genes E1, E2, E4 e E5 aumenta, aumentando também o número de cópias do genoma viral nas células. A ativação do promotor *Late* faz com que se inicie a expressão dos genes L1 e L2, ocorrendo então a montagem do capsídeo viral, que ocorre no núcleo, e liberação dos vírions quando as células alcançam a superfície do epitélio (figura 2) (KADAJA *et al.*, 2009). O ciclo e replicação do vírus leva de duas a três semanas, uma vez que esse é o tempo necessário para a diferenciação de um queratinócito (STANLEY, 2010).

Figura 2 - Ciclo de vida do HPV e genes expressos em cada etapa da replicação viral



Fonte: Adaptado de Gheit (2019).

1.4 Epidemiologia

A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo e o vírus possui maior prevalência em mulheres jovens (PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). Mundialmente, o tipo de alto risco oncogênico mais comum em mulheres com citologia cervical sem anormalidades é o 16, seguido pelos tipos 52, 53, 31, 51, 18, 58, 66, 39 e 56. Já em pessoas com câncer cervical, os tipos mais comuns são o 16 e o 18, sendo os dois juntos responsáveis por quase 70% dos casos, seguidos pelos tipos 45, 33, 58, 52, 31, 35, 39 e 59 (BRUNI *et al.*, 2023).

Virtualmente, todos os casos de câncer de colo de útero podem ser atribuídos à infecção por HPV (OMS, 2023). O HPV tem uma alta prevalência na população brasileira. Colpani *et al.* (2020), através de uma metanálise, identificou uma prevalência de 25,41% na região cervical e de 25,68% na região anal. Estima-se que mais de 17 mil mulheres são diagnosticadas e cerca de nove mil morrem de câncer de colo de útero no Brasil anualmente (BRUNI *et al.*, 2023). O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo e estima-se que mais de 300 mil mulheres morreram da doença em 2022 (OMS, 2023).

Com relação ao câncer anal, estima-se que em 2020 houve 29.159 casos de câncer anal em mulheres e 21.706 em homens. O câncer anal é raro na população geral, porém sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, em ambos os sexos (CLAVERO *et al.*, 2016; VALADÃO *et al.*, 2023). A infecção por HPV responde por cerca de 90% dos casos de câncer de células escamosas do canal anal, o tipo mais comum de câncer anal, sendo o HPV 16 o tipo mais frequentemente encontrado (BUCCHI *et al.*, 2016). No mundo, os tipos mais comuns de HPV no câncer anal são o 16, o 18 e o 33 (BRUNI *et al.*, 2023). No entanto, dados sobre prevalência de infecção anal por HPV são escassos.

1.5 Patogênese

O HPV apresenta tropismo pelas células da camada basal do epitélio escamoso, ainda indiferenciadas, e por células escamosas metaplásicas encontradas nas junções

escamocolumnares (JECs), regiões de transição entre os epitélios escamoso e colunar, que contém células embrionárias residuais. Isso faz com que o vírus tenha predileção por áreas do organismo humano onde as JECs estão presentes. O vírus tem acesso às células da camada basal através das microlesões geradas no epitélio durante o ato sexual, iniciando-se assim a infecção. A presença das JECs na região anal e na cérvix facilita esse acesso, o que pode explicar a maior incidência de carcinomas nesses locais em relação aos demais revestidos por epitélio escamoso, como vulva e pênis (YANG *et al.*, 2015). Existem evidências de outras formas de transmissão do vírus, como através de instrumentos utilizados em exames médicos e a transmissão vertical, bem como evidências de resistência dos HPVs aos desinfetantes mais comuns (MEYERS *et al.*, 2014; RYNDOCK; MEYERS, 2014; PETCA *et al.*, 2020). Porém, a principal via de transmissão é a sexual (RYNDOCK; MEYERS, 2014). O período de incubação do vírus pode variar de três semanas a oito meses ou mais (STANLEY, 2010).

Além de infectar células escamosas, os HPVs podem infectar células glandulares e neuroendócrinas, causando adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso ou carcinoma neuroendócrino. No entanto, são ocorrências bem mais raras (PARK, 2019; LU; LI; WANG, 2022).

Os HPVs são categorizados, clinicamente, em HPVs de alto e de baixo risco oncogênico, de acordo com seu potencial de transformação celular. São ainda categorizados em HPVs cutâneos ou de mucosa. Existem 17 tipos de HPVs de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82) e três tipos que provavelmente são de alto risco (HPVs 25, 53 e 56) (BURD, 2003; BISHOP *et al.*, 2024). Os HPVs 16 e 18 são os tipos de alto risco mais frequentemente associados aos casos de câncer cervical, sendo responsáveis por 70% dos casos (BURD, 2003; KUSAKABE *et al.*, 2023). Além do câncer cervical, os HPVs que infectam as mucosas também estão associados com casos de câncer do ânus (KRZOWSKA-FIRYCH *et al.*, 2019), pênis (THOMAS *et al.*, 2021), vulva (LEBRETON *et al.*, 2020), vagina (ADAMS; ROGERS; CUELLO, 2021) e câncer de cabeça e pescoço, principalmente de orofaringe (SABATINI; CHIOCCA, 2019). Os HPVs de baixo risco, como os tipos 6 e 11 estão relacionados, principalmente, a casos de condilomas acuminados (lesões verrucosas benignas na vulva, períneo e região perianal) e outras lesões cutâneas, como cistos epidermóides.

Além disso, também podem causar papilomatose respiratória recorrente, tumores benignos que afetam a laringe ou traqueia, em crianças (GHEIT, 2019).

A maior parte da população entra em contato com HPVs anogenitais em algum momento da vida (GRAHAM, 2017), mas a tendência é de que o vírus seja eliminado pelo sistema imune, dentro de 1 a 2 anos sem causar maiores problemas, sendo a ocorrência de câncer um evento raro. É devido à atuação do sistema imunológico, principalmente a imunidade celular que, em grande parte dos casos, a infecção é controlada e não progride até o estágio de doença maligna (XUE *et al.*, 2017). Porém, quando ocorre persistência, a eliminação do vírus se torna difícil para o sistema imunológico (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). Em cerca de 10-20% das mulheres a infecção pelos HPVs anogenitais se torna persistente e em apenas uma pequena parcela destas, ocorre evolução para neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que são estágios de doença cervical precursoras do câncer, e para o câncer cervical invasivo (STANLEY, 2010; GRAHAM, 2017). Pode levar anos para a infecção progredir para câncer invasivo, já que as mudanças na expressão gênica das células induzidas pelo HPV ocorrem de forma lenta e progressiva (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). O sistema imune inato exerce importante papel no reconhecimento e eliminação do vírus. A pele e as membranas mucosas íntegras são importantes barreiras contra a entrada do vírus e o muco produzido nas mucosas contém substâncias antimicrobianas, o que dificulta ainda mais a infecção dos queratinócitos (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). Os próprios queratinócitos possuem papel fundamental na resposta imunológica inicial. Funcionando como células apresentadoras de antígeno não profissionais, são capazes de induzir produção de citocinas pró-inflamatórias e resposta citotóxica das células T (AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de defesa contra o vírus consiste na estimulação da produção da proteína IFI16, que funciona como um sensor de DNA exógeno na célula, pela presença do interferon- γ . Essa proteína dificulta a replicação e transcrição do genoma do HPV. Além disso, sabe-se que a expressão de receptores tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLR) (como TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), que atuam detectando DNA exógeno, está aumentada nos queratinócitos de mulheres que estão em processo de eliminação do vírus (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). Devido ao reconhecimento do DNA

viral pelos TLRs, pode haver produção de citocinas importantes, como os Interferons (IFN) do tipo 1, fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha* - TNF- α) e interleucina (IL) do tipo 18, para o recrutamento de células da imunidade inata, como as células exterminadoras naturais (*Natural Killer* - NK), células dendríticas e macrófagos, criando um microambiente inflamatório. Além disso, algumas quimiocinas como CCL2, CCL20, CXCL9, também são produzidas, facilitando o recrutamento dessas células, além de células da imunidade adaptativa como as TCD4⁺ e TCD8⁺ (GUTIÉRREZ-HOYA; SOTO-CRUZ, 2021).

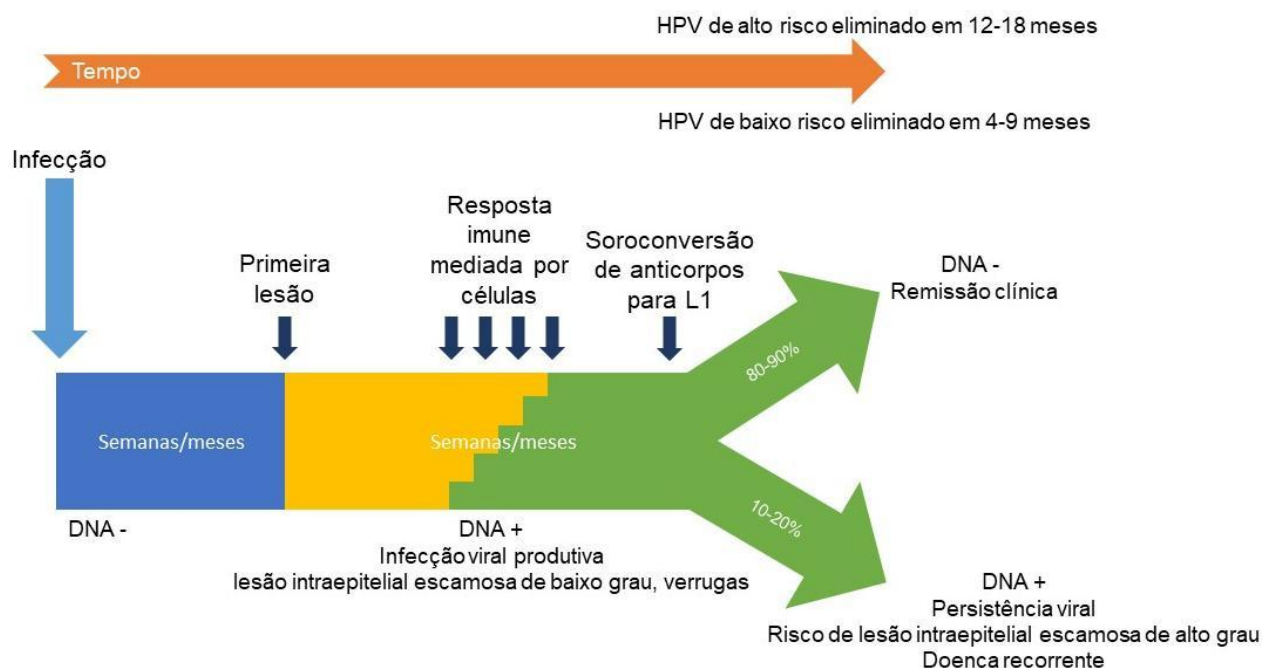
Vários receptores das células NK reconhecem moléculas usualmente expressas pelas células do câncer cervical. Isso, em conjunto com a diminuição ou ausência de receptores inibitórios, promove a lise celular e a produção de citocinas pró inflamatórias (GUTIÉRREZ-HOYA; SOTO-CRUZ, 2021). As células apresentadoras de antígeno presentes nesse microambiente também expressam receptores de reconhecimento de padrões, detectando o HPV, o que leva à expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas que tem importante papel na ativação das células T (GUTIÉRREZ-HOYA; SOTO-CRUZ, 2021). As células T são essenciais para a eliminação de células infectadas pelo vírus, à medida que produzem grânulos citotóxicos que induzem a morte das células infectadas. Parece existir uma correlação entre a presença de linfócitos T citotóxicos no epitélio e a regressão de lesões pré-cancerosas.

O HPV utiliza diversos mecanismos para evadir a resposta imune gerada pelo hospedeiro, necessários para gerar uma infecção bem-sucedida e para a persistência viral (AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013). O vírus não induz a lise celular, o que é uma forma de se manter “escondido” do sistema imunológico. Uma forma de evasão é a modulação epigenética da expressão gênica do hospedeiro. A oncoproteína E7 do HPV, por exemplo, interage com a enzima metiltransferase DNMT1, responsável por adicionar grupos metil ao DNA, estimulando sua atividade e promovendo a hipermetilação do promotor do gene que codifica a quimiocina CXCL14. Isso culmina com uma redução na expressão desta quimiocina, fundamental para a quimiotaxia de várias células do sistema imune inato e adaptativo, o que contribui para a persistência do vírus (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). O HPV também é capaz de reprimir, através da modulação epigenética das histonas do hospedeiro, a transcrição de TLR9, um receptor que

reconhece DNA viral e induz resposta do sistema imune inato, com a produção de citocinas pró inflamatórias (AMADOR-MOLINA *et al.*, 2013; WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). Além disso, a proteína E7 é capaz de reduzir a expressão de IFN- β e CCL2, importantes moléculas na resposta antiviral, contribuindo para a evasão imune (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017).

As oncoproteínas virais também desregulam a atividade de fatores de transcrição importantes na resposta imune, como o fator nuclear- κ B (*Nuclear factor- κ B* - NF- κ B), reduzindo a produção de citocinas pró inflamatórias como IFN- α , IL-6, IL-8 e TNF- α (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). As células exterminadoras naturais T (*Natural Killer T* - NKT) reconhecem antígenos através do receptor CD1d. Porém, a proteína E5 do HPV é capaz de suprimir a apresentação de antígenos através desse receptor em células infectadas e, então, não são reconhecidas pelas células NKT. As lesões cervicais resultantes da infecção pelo HPV possuem um microambiente anti-inflamatório, geralmente com altos níveis de IL-10, em comparação com pacientes não infectados pelo HPV, e aumento da expressão de outras citocinas anti-inflamatórias como TGF- β 1 and TGF- β 2. Essas citocinas são produzidas por células T regulatórias (Treg), inibindo a resposta das células T efectoras. Já foi observado que a persistência da infecção e evolução para lesões precursoras de carcinoma está correlacionada com a alta presença de células Treg (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017; KUSAKABE *et al.*, 2023). Todos esses mecanismos podem favorecer a persistência da infecção pelo HPV, o que pode culminar na transformação celular, no desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e na progressão para o câncer. A figura 3 mostra a progressão da infecção pelos HPVs ao longo do tempo, desde a infecção até a persistência, em que proporção cada uma das situações ocorre e o tempo decorrido até o surgimento de lesões e até a eliminação do vírus.

Figura 3 - Progressão da infecção pelo HPV ao longo do tempo, desde o início da infecção até a eliminação ou persistência viral.



Fonte: Adaptado de Stanley (2010).

1.6 Oncogênese

Quando uma infecção persistente causada por um HPV de alto risco é estabelecida, pode ocorrer integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, causando uma pequena deleção no ORF E2 do genoma viral. Assim, a função repressora que essa proteína exerce sobre os genes E6 e E7 é desativada, o que permite um aumento e uma expressão constante dessas proteínas, podendo levar a transformações malignas e desenvolvimento de câncer (figura 4) (GALLO *et al.*, 2003; GRAHAM, 2017).

Nos HPVs de alto risco oncogênico as proteínas E6 e E7 estão relacionadas com a malignização de lesões celulares. Essas proteínas têm como alvo as proteínas p53 e pRbs (pRb, p107 e p130), respectivamente (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). A proteína p53 exerce um importante papel na regulação do ciclo celular, reparando danos ao DNA e induzindo a célula à apoptose quando necessário. Com a sua degradação, os danos ao material genético não são reparados, levando à proliferação celular descontrolada. A

proteína E7 induz a reentrada das células já diferenciadas na fase S do ciclo celular através da liberação e ativação de um fator de transcrição, que induz a degradação das proteínas do retinoblastoma (codificadas pelo gene Rb), família de proteínas supressoras de tumor, responsáveis pela regulação do ciclo celular (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). A mudança da fase G1 para a fase S permite que o vírus utilize a maquinaria celular para a replicação do próprio genoma. Normalmente a reentrada na fase S levaria à ativação da p53, que suspende o ciclo celular e promove o reparo de danos ao material genético ou a apoptose, porém, com a degradação da p53, isso não ocorre (LETO *et al.*, 2011; BANSAL; SINGH; RAI, 2016; GUTIÉRREZ-HOYA; SOTO-CRUZ, 2021). Além disso, a proteína E7 tem a capacidade de induzir instabilidade genômica e mudanças no número cromossômico, o que é mostrado por estudos que observaram a ocorrência de aneuploidia em cânceres associados ao HPV (LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

Figura 4 - Sequência de acontecimentos que precedem a transformação celular, após o estabelecimento de infecção persistente por HPV



Fonte: Adaptado de Gheit (2019).

A proteína E6 também é responsável pela ativação da subunidade catalítica da telomerase. Em células somáticas, não há atividade da telomerase, o que leva a diminuição gradual dos telômeros com as divisões celulares. A ativação da enzima pela proteína E6 leva, então, à imortalização celular (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). Além

disso, a E6 pode se ligar e degradar a proteína Bak, promotora da ativação da cascata de caspases e a apoptose. As proteínas E6 e E7 também controlam a expressão de alguns microRNAs celulares, prevenindo a apoptose e permitindo o crescimento celular em queratinócitos em diferenciação (GRAHAM, 2017).

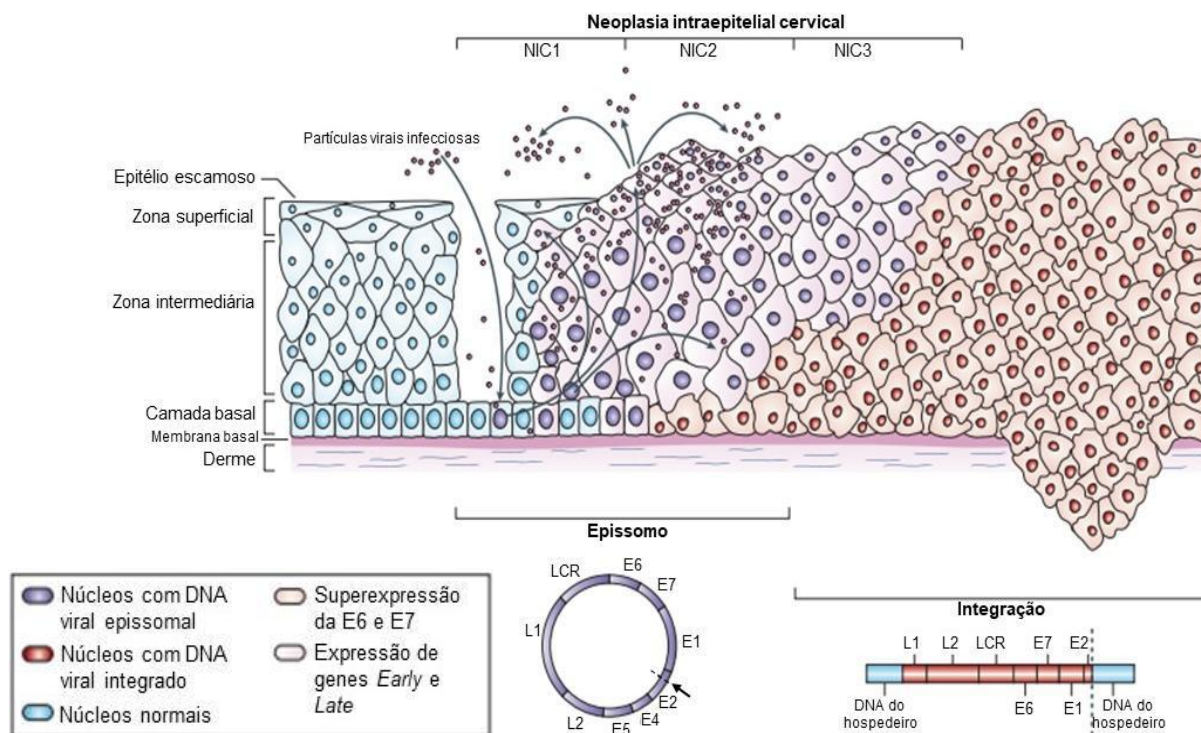
Além de aumentar a expressão dos oncogenes, a integração do genoma viral ao genoma da célula gera várias alterações genéticas como rearranjos cromossômicos e instabilidade cromossômica próximo do local de integração do genoma viral. Com o acúmulo dessas alterações no DNA do hospedeiro, as células infectadas podem progredir para o câncer (KUSAKABE *et al.*, 2023).

A ocorrência de câncer de colo de útero é precedida por NIC, lesões displásicas divididas em três estágios (NIC1 - leve, NIC2 - moderada e NIC3 - grave), que evoluem de forma gradual (STANLEY, 2010). Essas lesões precursoras também podem ser classificadas em lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesion* - LSIL), que corresponde à NIC1 e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High-grade squamous intraepithelial lesion* - HSIL) que corresponde a NIC2 e NIC3 (figura 5) (KOSHIOL *et al.*, 2008; KUSAKABE *et al.*, 2023). Geralmente, NIC1/LSIL é uma lesão que requer acompanhamento e não um tratamento imediato e podem ser causadas por HPVs de alto e baixo risco, com os de alto risco representando uma maior proporção (KOSHIOL *et al.*, 2008; STANLEY, 2010). Nesse caso, as células ocorrem individualmente ou em agregados, são células grandes, com citoplasma grande e bem definido e a membrana nuclear varia de um contorno levemente alterado à muito irregular (KOSHIOL *et al.*, 2008; NAIAR; WILBUR, 2015). As HSIL são caracterizadas por anormalidades cromossômicas e instabilidade genética (STANLEY, 2010). Células de HSIL podem ocorrer isoladamente ou formando um sincício, são menores e mais imaturas que as de LSIL, além de terem um citoplasma reduzido e uma razão entre tamanho do núcleo e tamanho do citoplasma maior que nas LSIL. As células das HSIL também apresentam, geralmente, contorno da membrana nuclear irregular (NAIAR; WILBUR, 2015).

Após o último estágio de neoplasia cervical, pode ocorrer o surgimento do carcinoma invasivo. As células neoplásicas podem romper a membrana basal das células

epiteliais, invadindo o tecido abaixo (figura 5) (SELLORS; SANKARANARAYANAN, 2003).

Figura 5 - Representação da progressão da infecção pelo HPV no epitélio escamoso, desde o epitélio sem alterações até o câncer invasivo



Fonte: Adaptado de Woodman; Collins; Young (2007).

Além da infecção por HPVs de alto risco, outros fatores contribuem para a ocorrência do câncer cervical, como o tabagismo, uso de contraceptivos orais combinados, possuir múltiplos parceiros sexuais, início precoce da vida sexual, além de imunossupressão causada pela infecção por HIV ou uso de medicamentos (BOWDEN *et al.*, 2023; JAIN; LIMAIE, 2025).

Os HPVs de alto risco também podem gerar câncer do canal anal. Assim como no câncer cervical, os cânceres anais são precedidos por lesões, conhecidas como lesão intraepitelial escamosa ou neoplasia intraepitelial anal (NIA) (BUCCHI *et al.*, 2016; CLAVERO *et al.*, 2016). Semelhante ao câncer cervical, as HSILs são consideradas precursoras do câncer. A infecção pelo HPV no ânus tem como principal causa relações sexuais desprotegidas. Porém, a presença do HPV na cérvix em mulheres é um fator

de risco para a infecção anal. Muitos trabalhos encontraram HPVs de mesmo genótipo nas duas regiões em mulheres, o que sugere que a infecção cervical pode ser a fonte da infecção anal, por conta da proximidade entre as regiões (BUCCHI *et al.*, 2016).

Assim como no câncer cervical, o câncer anal parece ser mais comum nas regiões de transição entre epitélio escamoso e colunar do canal anal (BUCCHI *et al.*, 2016). Apesar da semelhança, a incidência de câncer cervical é bem maior do que a de câncer anal, o que pode ser explicado por algumas diferenças histológicas entre as duas regiões (YANG *et al.*, 2015). O câncer anal é muito comum em homens que fazem sexo com homens (HSH) e em mulheres com histórico de neoplasia ou lesão pré neoplásica vulvar (VALADÃO *et al.*, 2023). Um estudo encontrou uma prevalência de 88,6% do DNA do HPV em amostras da mucosa anal de HSH (GARBUGLIA *et al.*, 2015).

Como a resposta imune é essencial para eliminar a infecção e impedir a progressão das lesões, pessoas imunocomprometidas estão em risco. Por isso, o câncer anal também é mais comum em pessoas vivendo com HIV e em pessoas que utilizam drogas imunossupressoras (PALEFSKY *et al.*, 2011; BUCCHI *et al.*, 2016; VALADÃO *et al.*, 2023). Portadores de doença inflamatória intestinal (DII), uma condição crônica, normalmente necessitam da utilização de drogas imunossupressoras como parte do tratamento, o que pode representar um risco a essa população, já que se sabe que existe associação entre neoplasias induzidas pelo HPV e imunossupressão (KANEDA *et al.*, 2015; DREYER, 2018; FUKUDA; NAGANUMA; KANAI, 2019; PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). No entanto, dados sobre a prevalência do HPV em pacientes com DII são escassos (SHAH *et al.*, 2015).

1.7 Doença inflamatória intestinal (DII)

A doença inflamatória intestinal consiste em um conjunto de condições crônicas e imuno-mediadas, que causam inflamação no trato gastrointestinal (TGI). Compreende, principalmente, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017; FLYNN; EISENSTEIN, 2019). A causa das duas doenças ainda não é bem compreendida, mas acredita-se que seja multifatorial, resultando de fatores imunológicos, genéticos e ambientais (FLYNN; EISENSTEIN, 2019).

A doença de Crohn é uma doença sistêmica, recidivante, caracterizada por manifestações gastrointestinais e também extraintestinais (BAUMGART; SANDBORN, 2012). Acredita-se que a DC seja resultante de uma resposta imunológica anormal à microbiota residente do intestino, diminuição da diversidade microbiana e do comprometimento da integridade da barreira intestinal (BAUMGART; SANDBORN, 2012). Na DC, as lesões podem ocorrer de forma descontínua e podem afetar qualquer parte do TGI (FLYNN; EISENSTEIN, 2019; BRUNER; WHITE; PROKSELL, 2023). Além disso, as lesões na DC são profundas, afetando toda a parede intestinal (IRWIN *et al.*, 2017; EBRAHIMI *et al.*, 2024). Pacientes com DC apresentam períodos de atividade e remissão. Os principais sintomas da doença são dor abdominal, febre, diarreia aquosa ou sanguinolenta e anemia, mas dependendo da gravidade com que a doença se apresenta, pode causar uma variedade de outros sintomas, incluindo sintomas sistêmicos como fadiga, e complicações como obstrução e perfuração intestinal (IRWIN *et al.*, 2017; FLYNN; EISENSTEIN, 2019).

A RCU é uma doença crônica, cuja patogênese também não está completamente elucidada, assim como na DC. Acredita-se que a causa também seja multifatorial e envolva predisposição genética, resposta imune desregulada e defeitos da barreira epitelial (FUKUDA; NAGANUMA; KANAI, 2019). Na RCU, a inflamação ocorre apenas no intestino, especificamente no cólon e no reto. Além disso, as lesões são mais superficiais do que na DC e a inflamação se apresenta de forma contínua. Os principais sintomas são sangue nas fezes, que ocorre na maioria dos pacientes, dor abdominal, tenesmo e podem ocorrer sintomas sistêmicos como fadiga, perda de peso e febre em alguns casos. Os sintomas extra intestinais são menos comuns na RCU do que na DC (FLYNN; EISENSTEIN, 2019). Estudos indicam que a incidência e a prevalência da DC e da RCU tem aumentado nos últimos anos, mundialmente (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Esse aumento já havia sido observado em países ocidentais desenvolvidos desde a metade do século 20, porém, nos últimos anos isso também tem sido observado em países da África, Ásia e América do Sul. A prevalência da doença na população chega a mais de 0,3% em países da América do Norte, da Europa e na Austrália. Nesses países, a prevalência de DC pode chegar a 135,6 a cada 100 mil habitantes e a RCU a 198 a cada 100 mil habitantes (NG *et al.*, 2017). No Brasil, a

prevalência da DC é baixa em comparação com os outros países citados (0,60 a 6,75 por 100 mil habitantes). Para a RCU, a prevalência é de 2,42 a 21 a cada 100 mil habitantes, porém, tem sido observado aumento na incidência de ambas as doenças nos últimos anos (NG *et al.*, 2017).

Evidências sugerem que a incidência de câncer anal em pacientes com DII pode ser maior que na população geral (CANAVAN; ABRAMS; MAYBERRY, 2006; VUITTON *et al.*, 2018). O tratamento das DII envolve o uso medicamentos que modulam a resposta inflamatória ou imunossupressores para controlar os sintomas e sabe-se que o uso desses medicamentos, além da própria inflamação crônica presente na doença, está associado com algumas neoplasias e infecções oportunistas (BAUMGART; SANDBORN, 2012; FUKUDA; NAGANUMA; KANAI, 2019). Já foi observado que o uso de imunomoduladores aumenta o risco de mulheres com DII desenvolverem neoplasia cervical (KREIJNE *et al.*, 2023). Evidências sugerem associação entre uso de medicamentos imunossupressores para o tratamento das DII com um maior risco de desenvolvimento de lesões precursoras e câncer cervical (BOWDEN *et al.*, 2023).

Um estudo de coorte conduzido por Rungoe *et al.* (2015) observou que mulheres com DII possuem um risco aumentado de desenvolver LSIL e HSIL. Além disso, observou que mulheres com DC possuem um risco maior de desenvolver câncer cervical e o uso de terapias imunossupressoras pode aumentar ainda mais esse risco (AUBIN *et al.*, 2011). Vuitton *et al.* (2018) analisou amostras oriundas de pacientes com DII e observou que a prevalência do HPV na região anal nessa população foi de 34,7%, sendo que 68,6% destes eram mulheres. Dos positivos para HPV, 25,7% eram HPVs de alto risco e 11% correspondiam ao HPV 16. Em pacientes com DC, a prevalência de HPVs de alto risco foi maior do que no restante da população do estudo. Entre os que faziam uso de drogas imunossupressoras, a prevalência da infecção por HPVs de alto risco foi maior do que naqueles que não utilizavam. No entanto, não há muitos dados disponíveis sobre a prevalência do HPV no ânus de pacientes com DII. Uma metanálise identificou apenas três estudos que analisaram a prevalência de HPVs de alto risco em pacientes com DII, o que evidencia uma lacuna de conhecimento nessa área (ALBUQUERQUE *et al.*, 2023).

1.8 Vacinas contra o HPV

As vacinas disponíveis atualmente contra o HPV utilizam a plataforma de partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* - VLPs), que consiste na montagem da proteína L1 do capsídeo, mimetizando uma partícula viral, como antígeno. Essas vacinas se baseiam na capacidade da proteína L1 de se auto-organizar em VLPs, induzindo uma resposta robusta de anticorpos neutralizantes (KIRNBAUER *et al.*, 1993; WILLIAMSON, 2023). A vacinação induz níveis bem mais altos de anticorpos específicos para os diferentes tipos de HPV do que a infecção natural (WILLIAMSON, 2023). Todas as vacinas disponíveis atualmente são seguras e eficazes na proteção contra a infecção, o surgimento das lesões escamosas de alto grau e o câncer cervical, além de protegerem contra o surgimento de verrugas genitais, dependendo da vacina (GOLDSTONE, 2023; WILLIAMSON, 2023).

Existem vacinas bivalentes (Cervarix®, Cecolin®), que protegem contra os tipos 16 e 18 do HPV, quadrivalentes (Gardasil®, Silgard®) que protegem contra os tipos 16, 18, 6 e 11 e uma vacina nonavalente (Gardasil9®), que protege contra os tipos 16 e 18, além de outros cinco tipos de alto risco (31, 33, 45, 52 e 58) e os de baixo risco oncogênico 6 e 11 (WILLIAMSON, 2023). No Brasil, a vacina distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é a quadrivalente e tem como público-alvo meninos e meninas de 9 a 14 anos, idade em que geralmente ainda não houve início da vida sexual e é menos provável que já tenha havido contato com o vírus (OPAS, 2024). Recentemente, o esquema vacinal de dose única foi adotado em substituição ao de duas doses (Ministério da Saúde, 2024a). Outros grupos aptos a receber a vacina pelo SUS são pessoas vivendo com HIV, transplantados e pacientes oncológicos (Ministério da Saúde, 2024a). Atualmente, a cobertura vacinal no Brasil está baixa. Entre as meninas de 9 a 14 anos, ela alcançou um pico em 2015 e desde então, caiu constantemente, chegando a apenas 69,05% em 2025. A cobertura vacinal sempre foi mais baixa nos meninos da mesma faixa etária e em 2025 somente 56,01% dessa população recebeu a vacina (Ministério da Saúde, 2025).

A vacinação para prevenção do HPV em pacientes com DII é recomendada devido ao risco aumentado de infecção persistente nessa população (KUCHARZIK *et al.*,

2021; PITTET *et al.*, 2021). A vacina é considerada segura para pacientes imunossuprimidos e é recomendável que estes sigam um esquema de três doses (KUCHARZIK *et al.*, 2021). Jacobson *et al.* (2013) administraram três doses de uma vacina quadrivalente em mulheres com DII recebendo tratamento com imunossupressores e observaram que houve uma boa soroconversão, de 100% para os tipos 6, 11 e 16 e 96% para o tipo 18. Além disso, não foi observado nenhum efeito adverso grave decorrente da vacina.

1.9 Diagnóstico de HPV

O diagnóstico da infecção por HPV se dá de forma clínica e laboratorial. Na presença de lesões como os condilomas acuminados, o diagnóstico é clínico. Como nem sempre a infecção pelo vírus resulta em lesões visíveis, métodos de rastreio como a citologia são essenciais. Nesse caso, são coletadas células da zona de transformação cervical com o auxílio de uma escova e é realizado um esfregaço em uma lâmina, que será analisada em busca de alterações celulares indicativas de infecção pelo HPV. Além da citologia convencional, existe a citologia em meio líquido, em que o material coletado é armazenado em uma solução de preservação e transportada a um laboratório onde a lâmina será confeccionada e analisada (RAJARAM; GUPTA, 2021). A colposcopia, exame ginecológico utilizado para visualização do colo do útero, e a biópsia, são também utilizadas no diagnóstico das lesões e do câncer.

A citologia anal é o teste mais utilizado no rastreio do câncer anal (STIER *et al.*, 2024). Assim como na citologia cervical, a coleta é realizada com a utilização de uma escova, que deve alcançar a zona de transição entre os epitélios escamoso e colunar. A associação da citologia e anuscopia de alta resolução, um exame de imagem, torna o rastreio do câncer mais efetivo (NADAL *et al.*, 2020). A testagem para presença de HPV no canal anal pode ser importante para identificar indivíduos com maior risco de progressão para HSIL ou câncer e também para diminuir as taxas de pacientes encaminhados para a anuscopia de alta resolução (STIER *et al.*, 2024). O rastreio de câncer anal é recomendável em idades específicas para pessoas na categoria A de risco, ou seja, grupos que apresentam maior incidência de câncer anal e que, portanto, tem

risco elevado de desenvolvê-lo. Estão incluídas nesse grupo pessoas vivendo com HIV, HSH, mulheres transgênero, pessoas com histórico de displasia ou câncer vulvar e pessoas que receberam transplante de órgãos sólidos. Na categoria de risco B, estão grupos que apresentam menor incidência de câncer anal comparados aos do grupo A, mas que ainda assim tem uma incidência elevada em comparação com a população geral. São incluídas pessoas com histórico de HSIL ou câncer cervical ou vaginal, verrugas perianais, infecção cervical persistente por HPV 16 e outros pacientes imunossuprimidos ou em tratamento contínuo com esteroides, como pessoas com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e DII (STIER *et al.*, 2024). Esses grupos, com idade acima de 45 anos, podem ser incluídos no rastreamento a partir de tomada de decisão conjunta (STIER *et al.*, 2024). A testagem para HPVs de alto risco, em conjunto ou não com a citologia, é considerada uma forma de rastreamento aceitável de câncer anal. É recomendado que pessoas com LSIL e um teste positivo para HPV de alto risco ou pessoas com resultado da citologia para HSIL, independente do resultado do teste para HPV, sejam encaminhadas para a anuscopia. Se o teste for positivo para HPV 16, é recomendado que o paciente seja encaminhado diretamente para a anuscopia, independente de diagnóstico citológico (STIER *et al.*, 2024).

O HPV não pode ser cultivado e o exame sorológico não é capaz de diferenciar uma infecção atual de uma infecção antiga, sendo os métodos moleculares e citológicos os mais apropriados para o diagnóstico da infecção viral (MOLIJN *et al.*, 2005). Como na infecção pelo HPV pode não haver nenhuma manifestação detectável pelos métodos citados (exame clínico, citologia, anuscopia), os métodos moleculares constituem uma importante abordagem no rastreamento do câncer cervical, com um grande valor preditivo (SCAGNOLARI *et al.*, 2016). Um estudo observou que a associação entre métodos citopatológicos, anuscopia e detecção do HPV por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) resultou em um aumento da sensibilidade do diagnóstico de lesões anais induzidas por HPV (NADAL *et al.*, 2020). A testagem do HPV, atualmente, é utilizada como teste complementar à citologia cervical para rastreamento do vírus. Existem testes moleculares aprovados pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para detecção dos HPVs de alto risco e pacientes

com resultado positivo para HPVs 16 ou 18 são indicadas para a colposcopia (EL-ZEIN; RICHARDSON; FRANCO, 2016).

Estudos mostram que a testagem do HPV para rastreamento da infecção cervical possui maior sensibilidade do que os métodos citológicos e que a testagem do HPV pode ser uma importante ferramenta de prevenção do câncer (REBOLJ *et al.*, 2022). Recentemente, o ministério da saúde incorporou a testagem molecular no SUS para o rastreamento do vírus buscando a prevenção do câncer de colo de útero (Ministério da Saúde, 2024b). Alguns estudos utilizaram a técnica de PCR para identificar o HPV em lesões e carcinomas de vulva, vagina e ânus (VUYST *et al.*, 2009). Porém, a testagem do HPV anal não é amplamente utilizada e não há um protocolo padronizado para testagem do vírus que utilize o método de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) neste sítio e nessa população.

A PCR é um método molecular que permite identificar a presença do DNA viral nas células, além de identificar especificamente o tipo causador da infecção. A qPCR é uma variação da técnica convencional que permite acompanhar os resultados à medida que a amplificação do material genético ocorre, e é amplamente utilizada no diagnóstico de infecções virais. É uma técnica precisa, capaz de identificar com alta sensibilidade a presença de material genético além de quantificá-lo, permitindo, assim, determinar a carga viral além da detecção do vírus (SCAGNOLARI *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2019). Existem alguns estudos que avaliaram o impacto da carga viral na infecção por HPV, porém, são escassos os que analisaram esse parâmetro na população com DII. Não se sabe se a carga viral pode funcionar como um marcador para o risco de progressão das lesões neoplásicas e câncer (MAIA *et al.*, 2015; SCAGNOLARI *et al.*, 2016; GUERENDIAIN *et al.*, 2022).

Na produção de um protocolo de utilização do método de qPCR, é essencial que se garanta uma reação de alta qualidade, sensível e específica. É importante que haja otimização dos reagentes utilizados e validação do protocolo para garantir a obtenção de dados reprodutíveis e que representem com precisão a questão biológica a ser investigada (TAYLOR *et al.*, 2019).

1.10 Justificativa

Considerando a escassez de estudos sobre a infecção por HPV em pacientes com DII, que podem estar em maior risco devido a resposta imune comprometida e a associação existente entre imunossupressão e surgimento de neoplasias (BOWDEN *et al.*, 2023), e que os HPVs de alto risco estão envolvidos em cerca de 90% dos cânceres anais (BUCCHI *et al.*, 2016), é importante realizar a testagem e a identificação dos tipos de HPV presentes nessa população, principalmente dos tipos mais frequentemente associados ao desenvolvimento de câncer. Existem vários estudos envolvendo outras populações, como as pessoas vivendo com HIV, que mostram uma forte associação entre neoplasias induzidas pelo HPV e imunossupressão (DREYER, 2018; PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). Mesmo quando não há lesão evidente, pode haver infecção pelo HPV e as técnicas moleculares são de grande valia para a detecção viral e para o rastreamento das lesões causadas pelo HPV, que podem ser tratadas, diminuindo o risco de câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar uma reação de PCR em tempo real para detecção dos HPVs de alto risco 16 e 18 em amostras de *swab* anal provenientes de pacientes com DII.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar avaliações *in silico* dos primers e sondas específicos para os dois tipos de HPV.
- Testar diferentes concentrações dos primers e sondas para uma maior eficiência da amplificação.
- Realizar análises de sensibilidade, especificidade e eficiência da reação.
- Validar os a reação através do teste de qPCR em amostras clínicas de pacientes com doença inflamatória intestinal.
- Determinar a carga viral das amostras clínicas positivas para HPV 16 e/ou 18.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de um estudo maior, intitulado “Prevalência e fatores de risco do Papilomavírus Humano anogenital em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal” com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o CAAE 46786721.1.0000.5133.

3.1 População

Para a validação do protocolo de qPCR, foram coletadas amostras de pacientes adultos, com diagnóstico de DC e RCU, no Centro de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF). O diagnóstico de DII foi estabelecido previamente. Foram coletadas um total de 184 amostras, divididas em 2 grupos: 50 pacientes do grupo controle e 134 pacientes com DII. Os pacientes do grupo controle consistem em pacientes saudáveis, atendidos de forma consecutiva, acompanhados no ambulatório de coloproctologia. Buscou-se coletar amostras de pacientes de maneira a aproximar sexo e idade com os grupos DC e RCU.

Os critérios de inclusão foram: idade igual ou maior que 18 anos com diagnóstico confirmado de DII e que concordaram em participar do estudo. Foi permitida a participação de pacientes recebendo tratamento com aminossalicilatos, tiopurinas, anti-TNF, esteroides sistêmicos ou antibióticos. Já os critérios de exclusão foram: idade abaixo de 18 anos ou superior a 65 anos, pacientes portadores de outras condições que levam à imunossupressão, como lúpus eritematoso sistêmico, neoplasias, (exceto cutâneas), artrite reumatoide, HIV positivos, transplantados, pacientes com diagnóstico prévio de NIC, NIA, carcinoma espinocelular ou com histórico de vacinação por HPV e pacientes submetidos à amputação abdominoperineal do reto. Pacientes que apresentam potencial para engravidar precisaram apresentar teste de gravidez negativo, além de ter sido solicitado a utilização de um método contraceptivo efetivo antes da coleta das amostras. Todos os pacientes que preenchiam os critérios de inclusão receberam um termo de consentimento livre e esclarecido contendo as explicações referentes à participação e às avaliações contidas na pesquisa.

Mulheres cujo resultado da qPCR foi positivo para HPV 16 e/ou 18 no ânus, foram convidadas para a coleta, também, de amostras cérvico-vaginais.

3.2 Coleta, manuseio e preparação das amostras

O exame físico e a coleta de material foram realizados sempre por duas médicas coloproctologistas. As coletas de amostras da região cérvico-vaginal foram realizadas sempre por uma ginecologista. Após um exame visual da margem anal e do períneo, as amostras foram coletadas com a utilização de uma escova estéril para coleta de células do canal anal (cytobrush). A escova foi introduzida até quatro centímetros da margem anal e foram feitos 5 movimentos de rotação. Posteriormente, o cytobrush foi inserido em um tubo falcon contendo 3mL de tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* - PBS) estéril. A coleta com a utilização do cytobrush e a utilização do tampão PBS foram baseados em estudos envolvendo coleta de material para citologia anal (CALORE *et al.*, 2009; SALIT *et al.*, 2009; WILEY *et al.*, 2013)

As amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório em caixa térmica contendo gelo reciclável. Alternativamente, as amostras foram mantidas sob refrigeração por no máximo 4 horas antes do transporte. Após a chegada ao laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento de serem submetidas a extração de DNA. O procedimento operacional padrão (POP) relativo à coleta e transporte das amostras encontra-se nos anexos. Anteriormente à extração do DNA, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas por vortexação. Foi adicionado o volume de amostra recomendado pelos fabricantes de cada kit de extração em microtubos estéreis de 1,5 ml. O volume remanescente foi armazenado em microtubos de 1,5 ml em freezer -80 °C, para realização de possíveis reextrações.

3.3 Extração do DNA

Não há um kit comercial de extração de DNA específico para amostras coletadas do canal anal. Por isso, optou-se por testar diferentes kits comerciais em algumas amostras coletadas, visando determinar sua eficácia e aplicabilidade e definir o protocolo

de extração. Foram testados os seguintes kits de extração: Wizard Genomic DNA Purification (Promega), PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) e Qiaamp DNA blood mini kit (Qiagen), seguindo as recomendações de cada fabricante. Foram selecionadas aleatoriamente duas amostras clínicas para os testes de extração de DNA, uma do grupo controle e outra do grupo de pacientes com doença inflamatória intestinal.

Como controle de qualidade da extração, foi realizada a quantificação do material genético por fluorimetria, utilizando-se o fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza da amostra também foi avaliada, por espectrofotometria, através da relação A260/280 (260nm:280nm) utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.4 Controle positivo

Os controles positivos foram adquiridos comercialmente. Foi realizada a síntese de trechos dos genes alvo dos primers para os HPVs 16 e 18. A sequência foi sintetizada com base no local de anelamento dos primers e sondas utilizados. As sequências, o comprimento dos genes e o vetor utilizado se encontram na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências sintetizadas comercialmente para utilização como controle positivo do HPV 16 e 18, comprimento das sequências e vetor utilizado para clonagem

Nome da sequência	Sequência (5' - 3')	Comprimento (pb)	Vetor
HPV 16 – E6	ATGCACCAAAAGAGAACTGC AATGTTTCAGGACCCACAGG AGCGACCCAGAAAGTTACCA CAGTTATGCACAGAGCTGCA AACAACTATACATGATATAAT ATTAGAATGTG	112	pUC19
HPV 18 – E6-E7	TAGCTGGGCACTATAGAGG CCAGTGCCATTCGTGCTGCA ACCGAGCACGACAGGAAAG ACTCCAACGACGCAGAGAA ACACAAGTATAAATGCATGG ACCTAAGGCAACATTGCAAG ACATTGTATTGCATTTAGAG CCCCAAAATGAAATTCCGGT TGACCTTCTATGTACAG	174	pUC19

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A concentração do DNA dos controles foi verificada através do fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.). A partir da obtenção da concentração e do comprimento do DNA molde (tamanho do vetor, de 2686 pb para o pUC19, somado ao tamanho do inserto), foi possível calcular o número de cópias por microlitro (μL) de cada um dos controles, segundo a fórmula apresentada na figura 6.

Figura 6 - Fórmula utilizada para o cálculo do número de cópias/ μL

$$\text{Número de cópias}/\mu\text{L} = \frac{[\text{c}] \text{ de DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Comprimento} \times 1 \times 10^{-9} \times 660}$$

Onde:

[c] de DNA: Concentração do DNA, em ng/mL

$6,022 \times 10^{23}$: Constante de Avogadro, em moléculas/mol

Comprimento: Tamanho do DNA molde (vetor + inserto), em pares de base (pb)

1×10^{-9} : fator de conversão para nanogramas

660: Peso molecular médio de um par de bases, em Dalton (Da)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

3.5 Reação de qPCR

Para a qPCR, foram testados o mix comercial iTaq™ Universal Probes One Step Kit (BIO-RAD) e o GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega). Foram utilizados os primers 5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3' (*forward*), 5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC -3' (*reverse*) e a sonda de hidrólise 5'-FAM-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-BHQ-3' (BHQ - *black hole quencher*), previamente descritos para detecção de HPV16 (JACQUIN *et al.*, 2013), assim como os primers 5'-CAGTGCCATTCGTGCTGCAA-3' (*forward*), 5'-GGAATTTTCATTTTGRGGCTCTAAA-3' (*reverse*) e a sonda de hidrólise 5'-FAM-TCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTAT-BHQ-3' previamente descritos para detecção do HPV18 (ŞAHINER *et al.*, 2014). Foi realizada análise de formação de estruturas secundárias dos primers, incluindo homodímeros, heterodímeros e *hairpins*, através do valor de energia livre de Gibbs (ΔG), utilizando o Oligoanalyzer™ (Integrated DNA Technologies, Inc.). Também foi avaliada a temperatura de *melting* e conteúdo GC dos primers *forward* e *reverse* e das sondas. Os controles positivos foram utilizados em todo o processo de padronização da reação.

Foram testadas variações na concentração dos primers e das sondas e das condições da ciclagem térmica. As condições de ciclagem utilizadas foram definidas com base nos trabalhos de Jacquin *et al.* (2013) e Şahiner *et al.* (2014), com modificações. O teste com variações na concentração dos primers de sondas é feito com o intuito de aumentar a sensibilidade, através da diminuição dos valores de C_q , e eficiência da reação (MORGANTE; BLAWID, 2016). Diferentes concentrações de magnésio também foram testadas. As reações foram realizadas em placas de 96 poços no sistema de PCR em tempo real QuantStudio™3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e um branco foi utilizado em cada placa, com a substituição do ácido nucleico por água ultrapura.

3.6 Construção de curva padrão e análise da performance do ensaio

Para cada um dos tipos virais foi construída uma curva padrão de DNA a fim de avaliar alguns parâmetros relacionados a performance do ensaio, como a eficiência,

sensibilidade e linearidade da reação. Para obtenção da curva, foi realizada reação de qPCR utilizando diluições seriadas (1:10) de cada um dos controles positivos, com concentração de DNA alvo inicial conhecida.

Para o alvo HPV 16, foi construída uma curva com cinco pontos (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 cópias de DNA por μL), em triplicata. Já para o HPV 18 a curva foi construída com seis pontos (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias de DNA por μL) também em triplicata. A curva padrão é obtida através da regressão linear do valor C_q (*quantification cycle* – ciclo de quantificação) sobre o logaritmo da quantidade de DNA inicial. O cálculo da eficiência da reação se dá a partir do *slope* da porção log-linear da curva-padrão, sendo $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100$. Também foi avaliado o coeficiente de correlação (r^2), que indica o quanto os valores encontrados são explicados pela reta, sendo desejável um valor $r^2 \geq 0.985$ (MORGANTE; BLAWID, 2016). Idealmente, a eficiência da reação deve ser de $100 \pm 10\%$ e o *slope* deve ter um valor entre -3,6 e -3,3 (Thermo Fisher Scientific, 2025a; Thermo Fisher Scientific, 2025b). Valores de *slope* menores que -3,3 indicam uma eficiência menor que 100% e valores maiores que -3,3 indicam eficiência maior que 100% (MORGANTE; BLAWID, 2016).

3.7 Especificidade

A especificidade dos primers e sondas foi analisada *in silico* através do alinhamento de sequências extraídas do GenBank no software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) e também através de análise utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Foi realizado um teste utilizando primers e sondas do HPV 16 para amplificação do HPV 18 e vice-versa. Além disso, foi feita uma reação utilizando o controle comercial de alta cobertura TaqMan Comprehensive Microbiota Control (ThermoFisher), que contém sequências de vários tipos de HPV, incluindo o 16, 18, 33, 31, 52, 39, 6, 11 e outros 27 tipos.

3.8 Validação e cálculo da carga viral

O protocolo foi validado utilizando as amostras recebidas dos pacientes, para detecção desses dois tipos virais. Como controle endógeno foi utilizado o gene da β-globina. Os primers e a sonda utilizados para a amplificação desse gene foram gentilmente cedidos pela profa. dra. Vânia Silva. As sequências dos primers e da sonda estão localizadas na tabela 2 (SCHMITZ *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Sequências dos primers e sonda utilizados na reação de amplificação do gene da β-globina

Oligonucleotídeo		Sequência (5'-3')
Primer <i>Forward</i>		ACACAACTGTGTTCACTAGC
Primer <i>Reverse</i>		CAACTTCATCCACGTTTACC
Sonda de	YAK YEL–TCAAACAGAZENCACCATGGTGCATCTGACTCC –	
hidrólise		3IABkFQ

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

A quantificação absoluta do número de cópias de DNA viral (carga viral) foi calculada a partir da obtenção do valor de x da equação reduzida da reta, gerada nos experimentos de curva padrão. Esse valor é dado em escala logarítmica. A equação da reta é mostrada na figura 7.

Figura 7 - Equação da reta utilizada para calcular a carga viral das amostras

$$Y = mx + b$$

Onde:
Y é a variável que representa o valor do ~~co~~ de cada amostra.
m é o coeficiente angular da reta, ou ~~slope~~.
b é o coeficiente linear da reta, ou seja, onde a reta intercepta o eixo y.
x é a variável independente. O valor de x, dado em escala logarítmica, representa a carga viral da amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

3.9 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram analisados de forma descritiva. Para variáveis quantitativas, foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão). Diferenças entre médias foram comparadas através do teste T de Student para amostras independentes, utilizando o software OpenEpi (DEAN; SULLIVAN; SOE, 2013). Para as variáveis categóricas, foram calculadas as proporções e apresentadas em percentuais (%), comparando os grupos de interesse. Para comparação de proporções entre grupos foram utilizadas tabelas de contingência 2x2 e teste exato de Fisher, através do software GraphPad Prism versão 10.4.1 (GraphPad Software, Inc.). Em todas as análises foi adotado um intervalo de confiança de 95,0%, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,050$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* dos primers e sondas

Inicialmente, os primers e sondas escolhidos foram os mostrados na tabela 3, descritos previamente por Şahiner *et al.* (2014).

Tabela 3 - Sequências dos primers e sondas escolhidos para HPV 16 e 18

Tipo viral	Primer <i>forward</i> (5'-3')	Primer <i>reverse</i> (5'-3')	Sonda de hidrólise (5'-3')
HPV 16	CAGATCATCAAGAACA CGTAGAGAA	CCAGCTGGACCATCTAT TTCAT	FAM- TGTAATCATGC ATGGAGATACA CCTACAT-BHQ
HPV 18	CAGTGCCATTTCGTGCT GCAA	GGAATTTTCATTTTGRGG CTCTAAA	FAM- TCCAACGACGC AGAGAAACACA AGTAT-BHQ

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A partir das análises dos oligonucleotídeos, observou-se que os primers *forward*, *reverse* e a sonda do HPV 16 continham conteúdo GC dentro do ideal (35% -80%). A diferença de temperatura entres os primers *forward* e *reverse* também foi ideal, menor que 5 °C. Com relação à formação de estruturas secundárias (homodímeros, heterodímeros e *hairpins*), o primer *forward* apresentou valores de ΔG maiores que -9 kcal.mol⁻¹. Quanto maior o valor do ΔG , menor a probabilidade de uma estrutura secundária se formar, seja ela uma ligação entre um mesmo primer (homodímeros), ligação entre primer *forward* e *reverse* (heterodímeros) ou dois pontos de uma mesma sequência se ligando, formando um grampo (*hairpins*). Contudo, nas análises de formação de homodímeros, o primer *reverse* e a sonda de hidrólise do HPV 16 apresentaram valores muito baixos de ΔG , indicando que é possível que essa estrutura se forme durante a reação. Já os primers e a sonda selecionados para o HPV 18 apresentaram todos os parâmetros dentro do ideal, incluindo baixa probabilidade de formação de estruturas secundárias. A análise das sequências extraídas do GenBank, descritas posteriormente, também não apresentou resultados satisfatórios para o

alinhamento dos oligonucleotídeos do HPV 16. Os resultados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Comprimento, conteúdo GC, temperatura de melting e análise de formação de estruturas secundárias dos primers e sondas dos HPVs 16 e 18

Parâmetro analisado	HPV 16			HPV 18		
	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Sonda de hidrólise	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Sonda de hidrólise
Comprimento (pb)	25	22	29	20	24	27
Conteúdo GC	40%	45,5%	37,9%	55%	35,4%	44,4%
Temperatura de <i>melting</i>	54,4 °C	54,6 °C	57,5 °C	59 °C	52,9 °C*	60,1 °C
Homodímeros (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta G > -9$	$\Delta G = -16,4$	$\Delta G = -13,9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$
Heterodímeros (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta G > -9$		-	$\Delta G > -9$		-
<i>Hairpins</i> (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$

*Temperatura apresentada como média, o primer reverse do HPV 18 é degenerado, portanto, a temperatura de *melting* apresenta variações. Optou-se por incluir uma média das temperaturas obtidas nas análises *in silico*.

Em vermelho estão apresentados os valores de ΔG abaixo do ideal.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Dessa forma, optou-se pela substituição dos primers e da sonda do HPV 16. Os novos primers e a sonda selecionados para o HPV 16 foram previamente descritos por Jacquín *et al.* (2013). As sequências e análises *in silico* são mostradas na tabela 5. Os primers e sondas escolhidos para os HPVs 16 e 18 tem como alvo, respectivamente, o gene E6 e E6-E7 dos genomas virais.

Tabela 5 - Novos primers e sonda para o HPV 16

Parâmetro analisado	Primer <i>forward</i> (5'-3')	Primer <i>reverse</i> (5'-3')	Sonda de hidrólise (5'-3')
Sequências	GAGAACTGCAATGTT TCAGGACC	TGTATAGTTGTTTG CAGCTCTGTGC	FAM – CAGGAGCGACCC AGAAAGTTACCAC AGTT – BHQ
Comprimento (pb)	23	25	29
Conteúdo GC	47,8%	44,0%	51,7%
Temperatura de melting	56,3 °C	57,6 °C	63,3 °C
Homodímeros	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$
Heterodímeros	$\Delta G = - 10,59$		-
Hairpins	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$	$\Delta G > -9$

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.2 Definição do protocolo de extração

Foram testados três diferentes kits comerciais para extração dos ácidos nucleicos: Wizard Genomic DNA Purification (Promega), PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher) e Qiaamp DNA blood mini kit (Qiagen), seguindo as recomendações de cada fabricante. Pode ser observado que o melhor resultado, analisando-se os parâmetros pureza e quantidade de DNA nas amostras extraídas, foi obtido com a utilização do kit de extração Qiaamp DNA blood mini kit (Qiagen) (Tabela 6). Sendo assim, este foi selecionado para realização das extrações de todas as amostras clínicas. O valor ideal da relação A260/280 é cerca de 1,8. Valores muito baixos podem indicar presença de proteínas ou outros contaminantes na amostra.

Tabela 6 - Comparação da concentração (em ng/ml) e pureza do material extraído através de diferentes kits de extração utilizando-se duas amostras clínicas

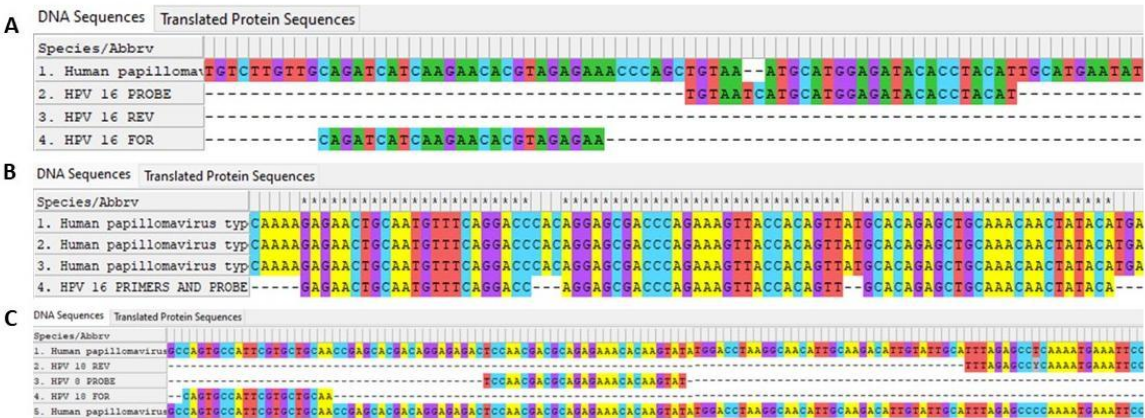
Kit de extração	C7 (ng/ml)	C7 (A260/280)	I5 (ng/ml)	I5 (A260/280)
PureLink™ RNA Mini Kit	2,18 x 10 ³	1,19	1,81 x 10 ³	1,34
Wizard Genomic DNA Purification	104	1,78	268	1,4
Qiaamp DNA blood mini kit	2 x 10 ³	1,77	1,75 x 10 ³	1,81

C7: grupo controle; I5: Grupo DII.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.3 Testes de especificidade

Através do alinhamento das sequências dos oligonucleotídeos com sequências virais retiradas do GenBank, utilizando o software MEGA, foi observado que a sonda inicialmente escolhida para o HPV 16 não se alinhou corretamente à sequência viral. Os novos oligonucleotídeos selecionados para o HPV 16 e os primers e a sonda selecionados para o HPV 18 se alinharam corretamente à sequência (Figura 8).

Figura 8 – Alinhamento das sequências de oligonucleotídeos



A: alinhamento incorreto de oligonucleotídeos inicialmente selecionados para HPV 16; B: novo alinhamento dos primers e da sonda para HPV 16; C: alinhamento dos primers e da sonda para HPV 18.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O alinhamento dos primers e sondas selecionados com as sequências contidas no BLAST mostrou que os oligonucleotídeos se alinharam com as respectivas sequências do HPV 16 e HPV 18, o que indica que são específicos. Após todas as análises *in silico*, os primers foram sintetizados.

Posteriormente, foi feito um teste em que os primers e a sonda do HPV 16 foram usados na reação com o controle positivo do HPV 18 e vice-versa. Foram utilizadas diluições dos controles positivos, em duplicata. Como não houve amplificação inespecífica, os primers foram considerados específicos para cada um dos tipos, sendo capazes de diferenciá-los. Não houve amplificação de nenhum tipo de HPV na reação em que foi utilizado o controle comercial de alta cobertura TaqMan Comprehensive Microbiota Control (Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.4 Padronização da qPCR

Os controles positivos adquiridos comercialmente foram utilizados em todo o processo de padronização da qPCR. Através da quantificação por fluorimetria verificou-se que a concentração de DNA do controle positivo do HPV 16 foi de $1,18 \times 10^5$ ng/ml ou 118 ng/ μ L. Para o HPV 18, a concentração calculada foi de $3,86 \times 10^4$ ng/ml ou 38,6 ng/ μ L. A partir desses dados e do tamanho calculado do DNA molde, foi possível determinar o número de cópias por μ L do controle positivo do HPV 16 (Figura 9) e do HPV 18 (Figura 10).

Figura 9 - Cálculo do número de cópias/ μ L do controle positivo do HPV 16

$$\text{Número de cópias}/\mu\text{L} = \frac{118 \times 6,022 \times 10^{23}}{2860 \times 1 \times 10^{-9} \times 660} = 3,764 \times 10^{10}$$

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 10 - Cálculo do número de cópias/ μ L do controle positivo do HPV 18

$$\text{Número de cópias}/\mu\text{L} = \frac{38,6 \times 6,022 \times 10^{23}}{2798 \times 1 \times 10^{-9} \times 660} = 1,258 \times 10^{10}$$

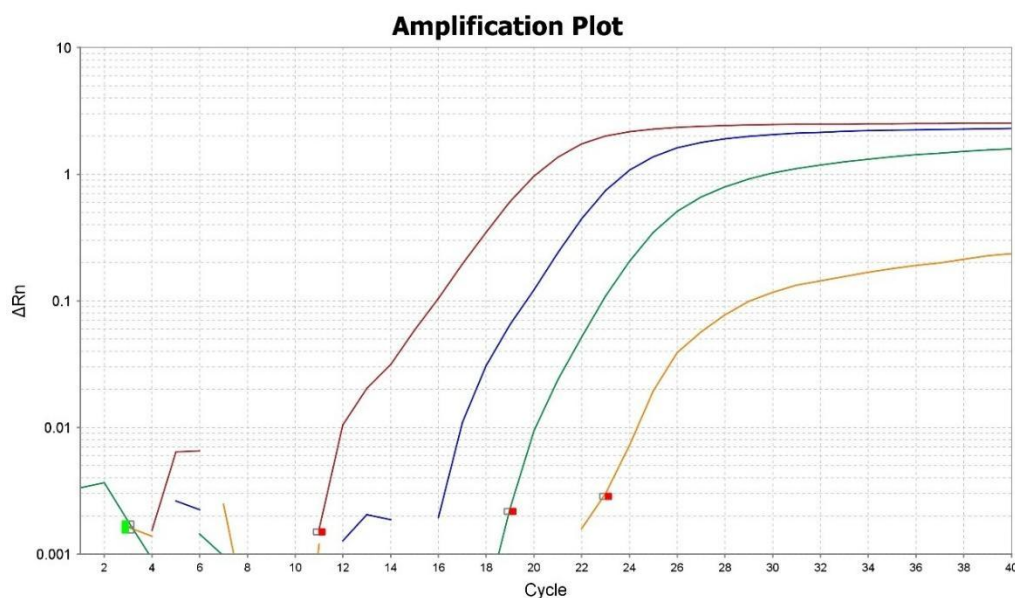
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Para facilitar os cálculos ao realizar a diluição seriada, inicialmente optou-se por diluir 2,656 µL da solução estoque do controle do HPV 16 em 97,34 µL de água ultrapura e 7,95 µL do controle do HPV 18 em 92,05 µL de água ultrapura, obtendo assim uma solução contendo 1×10^9 cópias/µL, ou um bilhão de cópias/µL para cada controle. A partir dessa solução, foi feita a diluição seriada (1:10) até a diluição 1×10^1 , ou 10 cópias/µL.

Com as diluições, inicialmente foi avaliada a sensibilidade da reação. Foram testados dois kits de qPCR, sendo o iTaq™ Universal Probes One Step Kit (BIO-RAD) o primeiro testado. Para a reação, foram utilizados primers a uma concentração final de 0,5 µM e sondas a 0,25 µM. O volume final da reação foi definido em 20 µL, contendo 5 µL de DNA de cada amostra, 2 µL de água, 10 µL de *master mix* com concentração de 2X, 1 µL de cada primer, 0,5 µL de sonda e 0,5 µL de polimerase. As condições de ciclagem utilizadas foram: denaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, 15 segundos cada, a 95 °C e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto.

Observou-se que, no caso do HPV 16, a PCR foi sensível apenas até a diluição 10^3 , ou seja, a reação é capaz de detectar, no mínimo, mil cópias por µL ou 5 mil cópias por reação (Figura 11). O valor de C_q da última diluição foi de 28,821.

Figura 11 - Teste de sensibilidade HPV 16



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Foi construída a curva padrão para o HPV 16 e a eficiência observada foi de 71,934%, bem abaixo do valor ideal. O *slope* também não ficou dentro do valor ideal, de -4,249.

Assim, visando aumentar a sensibilidade da reação de amplificação do HPV 16, foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (MgCl_2) adicionado à reação. As concentrações testadas foram: 0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM. Não houve melhora da sensibilidade com a adição de nenhuma concentração de MgCl_2 testada, optando-se então por manter a reação sem a adição desse reagente. Também foram testadas outras condições de ciclagem utilizando as diluições 10^3 , 10^2 e 10^1 , com 2 minutos a 50° C, seguido por 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de amplificação, 30 segundos cada, a 95 °C e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. Porém, optou-se por manter as condições iniciais de amplificação, uma vez que, não houve amplificação nas demais diluições testadas. Diferentes concentrações dos primers e sondas foram testadas com o objetivo de melhorar a eficiência e sensibilidade da reação. No entanto, não houve melhora que justificasse a utilização de concentrações diferentes das utilizadas inicialmente e optou-se por mantê-las (Tabela 7).

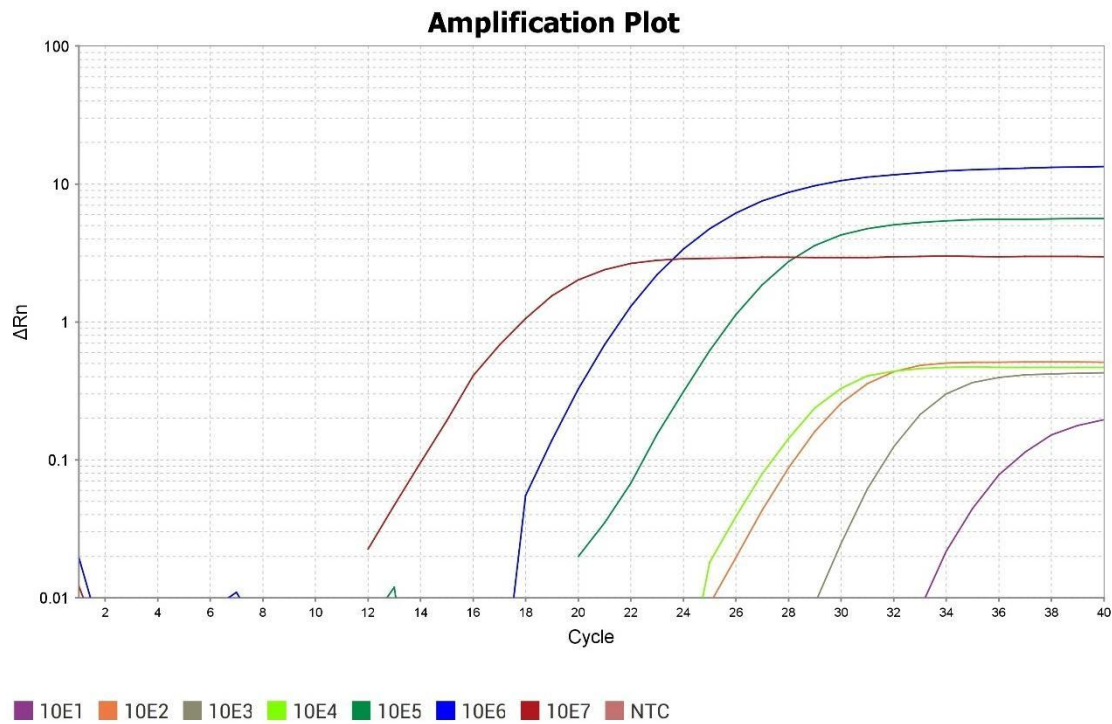
Foi testado outro kit de qPCR, o GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega), e observou-se um aumento considerável da sensibilidade da reação (Figura 12). Nesse caso, a PCR foi sensível até a diluição 10^1 , ou seja, a reação é capaz de detectar até 10 cópias por μL . O valor de C_q observado na última diluição foi de 37,496. Foi construída uma curva padrão (Figura 13) e o valor do *slope*, a eficiência e o r^2 também melhoraram. O valor do *slope* foi de -3,529, a eficiência foi de 92,032 e o r^2 foi de 0,985, todos valores aceitáveis.

Tabela 7 - Concentrações dos primers e sondas testadas nas diluições 10^7 e 10^4 e os respectivos valores de C_q obtidos

Oligonucleotídeo	[c] final (em μM)	C_q - diluição 10^7	C_q - diluição 10^4
Fwd/rev/sonda	0,5/0,5/0,25*	14,597	23,583
Fwd/rev/sonda	0,5/0,75/0,25	14,226	24,768
Fwd/rev/sonda	0,75/0,5/0,25	14,532	24,980
Fwd/rev/sonda	0,5/0,25/0,25	14,244	25,238
Fwd/rev/sonda	0,25/0,5/0,25	14,456	24,504
Fwd/rev/sonda	0,25/0,25/0,25	14,334	24,696
Fwd/rev/sonda	0,5/0,75/0,15	14,799	25,024
Fwd/rev/sonda	0,75/0,5/0,15	14,982	24,949
Fwd/rev/sonda	0,5/0,25/0,15	14,607	24,799
Fwd/rev/sonda	0,25/0,5/0,15	14,495	24,302
Fwd/rev/sonda	0,25/0,25/0,15	14,599	24,585
Fwd/rev/sonda	0,5/0,75/0,05	15,854	25,916
Fwd/rev/sonda	0,75/0,5/0,05	15,639	25,441
Fwd/rev/sonda	0,5/0,25/0,05	16,076	24,688
Fwd/rev/sonda	0,25/0,5/0,05	15,509	25,707
Fwd/rev/sonda	0,25/0,25/0,05	15,755	26,652
Fwd/rev/sonda	0,5/0,5/0,15	14,755	22,677
Fwd/rev/sonda	0,5/0,5/0,05	15,470	23,415

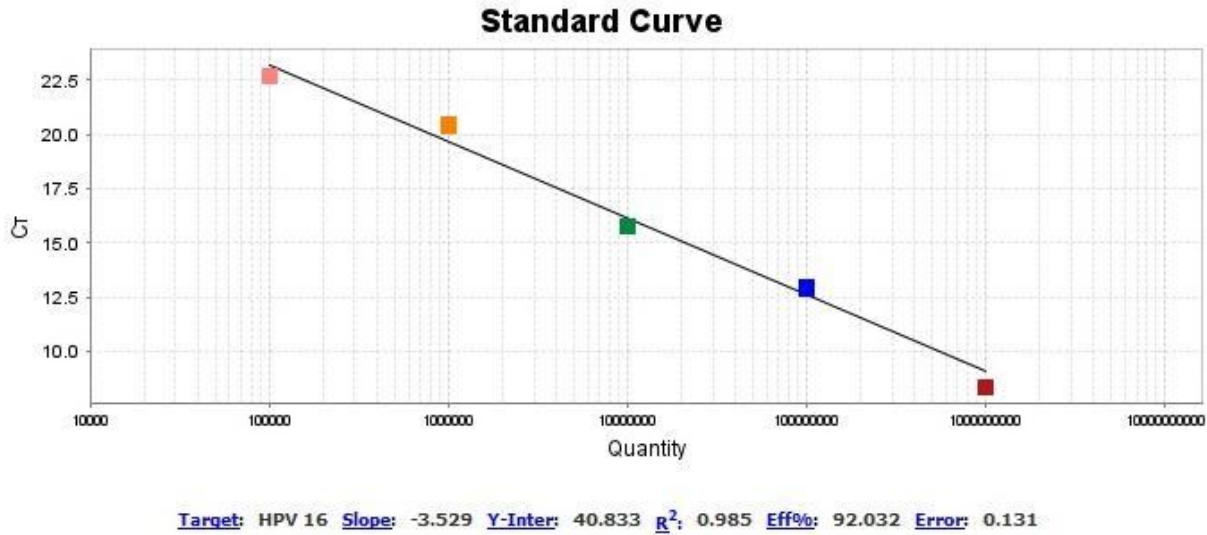
*concentração utilizada inicialmente para comparação; Fwd: primer *forward*; rev: primer *reverse*.
 Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 12 - Teste de sensibilidade HPV 16 utilizando o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

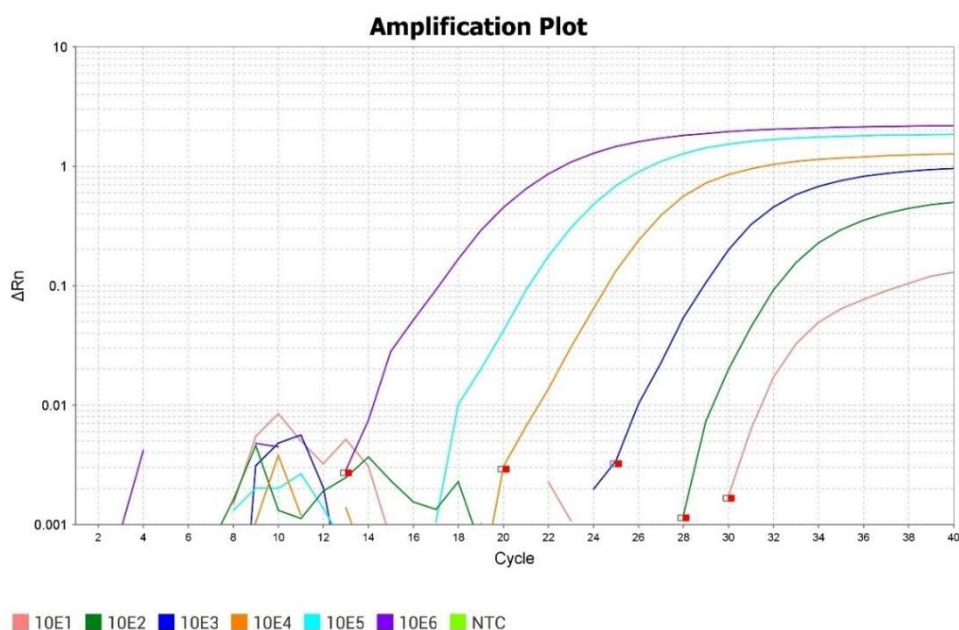
Figura 13 - Curva padrão construída para o HPV 16 contendo 5 pontos em triplicata



Na parte inferior da imagem são mostrados os valores de slope, r² e eficiência da reação.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

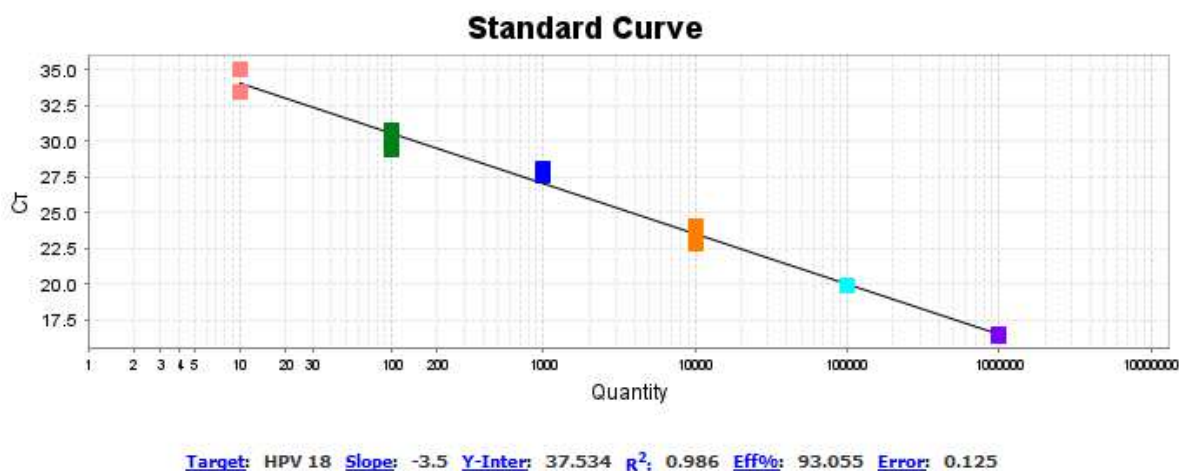
Para o HPV 18, a reação utilizando o iTaq™ Universal Probes One Step Kit (BIO-RAD) foi sensível até a última diluição testada, ou seja, 10 cópias/μL ou 50 cópias por reação (Figura 14), com um C_q de 34,269. Através da curva padrão construída (Figura 15) foi obtido um *slope* de -3,5, eficiência de 93,055 e um r^2 de 0,986, também dentro dos valores aceitáveis. A elaboração da curva padrão com o outro kit não melhorou nenhum dos parâmetros. Sendo assim, optou-se por não o utilizar no caso do HPV 18.

Figura 14 - Teste de sensibilidade HPV 18



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 15 - Curva padrão construída para o HPV 18 contendo 6 pontos em triplicata



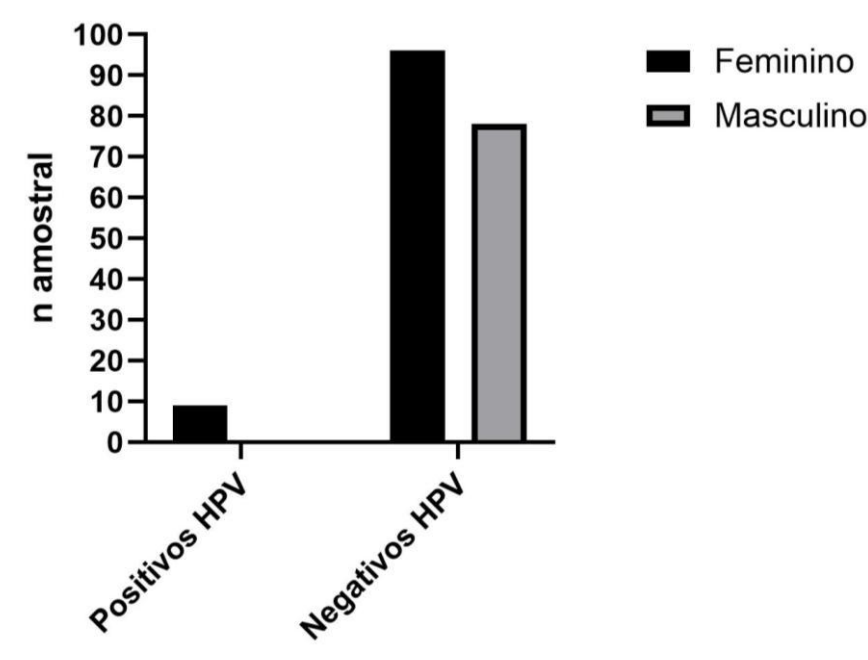
Na parte inferior da imagem são mostrados os valores de slope, r^2 e eficiência da reação.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.5 Validação e carga viral

Das 184 amostras da região anal coletadas, uma, do grupo DII, foi excluída das análises porque não houve amplificação da β -globina. De 183 amostras testadas, 9 foram positivas para pelo menos um tipo de HPV (4,92%). Destas, 22,22% eram do grupo controle e 77,77% eram do grupo com DII. Dos 50 pacientes do grupo controle, somente dois foram positivos (4,0%) e dos 133 pacientes do grupo DII, sete foram positivos (5,26%) (Tabela 8). Essa diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Dos pacientes com DII, 2,25% foram positivos para HPV 16 e 3,75% foram positivos para HPV 18.

No total, 105 pacientes (57,4%) eram do sexo feminino (24 do grupo controle e 81 do grupo DII) e 78 (42,6%) eram do sexo masculino (26 do grupo controle e 52 do grupo DII). Todos os positivos para um dos tipos de HPV eram mulheres (Figura 16). Houve diferença significativa entre positivos e negativos com relação ao sexo ($p = 0,0109$). Foram coletadas seis amostras cérvico-vaginais das mulheres cujo teste de qPCR foi positivo para um dos tipos de HPV no canal anal. Destas, uma foi positiva (16,7%) para o HPV 16, mesmo tipo de HPV encontrado no canal anal.

Figura 16 - Positivos e negativos para HPV 16 e 18 com relação ao sexo



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Considerando a infecção causada por apenas um tipo de HPV, o HPV 18 foi encontrado em cinco amostras do canal anal (quatro do grupo DII e uma do grupo controle) enquanto o HPV 16 foi encontrado em duas amostras (todas do grupo DII). Foi observada coinfecção entre os dois tipos de HPV em duas amostras (uma do grupo controle e uma do grupo DII) (tabela 8).

Tabela 8 - Frequência de amostras positivas no grupo controle e no grupo DII, quais os tipos encontrados e número de coinfecções

Grupo	Tipo viral	Número de positivos	Frequência (%) do total de positivos
Controle	HPV 16	0/9	0%
	HPV 18	1/9	11,11%
	Coinfecção	1/9	11,11%
DII	HPV 16	2/9	22,22%
	HPV 18	4/9	44,44%
	Coinfecção	1/9	11,11%

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

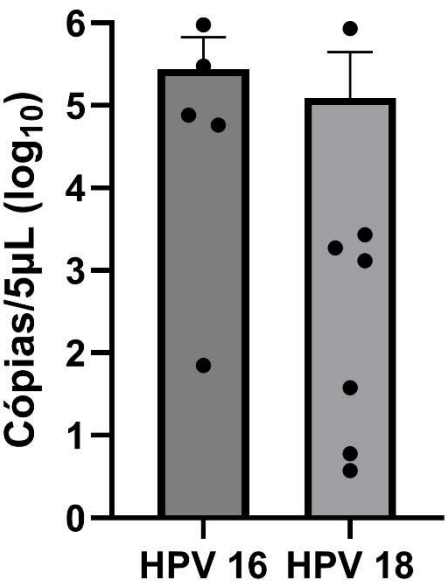
A carga viral das amostras variou entre 3,74 cópias/reação e 948.740,80 cópias/reação, em amostras positivas para HPV 18 e HPV 16, respectivamente. A carga viral da amostra cérvico-vaginal positiva para HPV 16 foi baixa, de 70,65 cópias/reação. A tabela 9 contém a média, mediana e o desvio padrão da quantidade de cópias por reação dos positivos para HPV 16 e 18. Não houve diferença estatística significativa entre a média de número de cópias do HPV 16 e do HPV 18 ($p>0,05$). A figura 17 mostra a média e o desvio padrão em escala logarítmica. Também não houve diferença significativa entre o valor médio da carga viral nos pacientes do grupo DII com relação ao controle ($p>0,05$).

Tabela 9 - Média, mediana e o desvio padrão da quantidade de cópias por reação dos positivos para HPV 16 e 18

Tipo viral	Média (cópias/5µL)	Mediana (cópias/5µL)	Desvio Padrão (cópias/5µL)
HPV 16	276.914,94	75.946,30	392.710,14
HPV 18	123.127,83	1.311,63	323.150,02

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 17 - Média e desvio padrão do número de cópias por reação dos positivos para HPV 16 e 18



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

5 DISCUSSÃO

A reação foi padronizada e mostrou um bom desempenho na amplificação do DNA viral nas amostras clínicas, além de apresentar alta sensibilidade. A curva padrão é um método importante para avaliar a qualidade da reação, pois fornece vários parâmetros que permitem verificar a performance de um ensaio. A eficiência da qPCR para detecção dos HPVs 16 e 18 foi de 92,032% e 93,055%, respectivamente, que são considerados valores satisfatórios. O ideal é que a eficiência de uma reação esteja o mais próxima possível de 100%, em que a quantidade de DNA inicial dobra a cada ciclo de amplificação, mas valores entre 90 e 110% são considerados aceitáveis. Reações com eficiência abaixo de 90% podem apresentar também baixa sensibilidade e, em amostras com mesma concentração de DNA, podem gerar valores de C_q discrepantes em relação à uma reação com eficiência mais próxima de 100%, impactando no cálculo da carga viral (Thermo Fisher Scientific, 2025a).

A eficiência da PCR pode ser afetada por vários fatores, como a qualidade da amostra, concentração dos componentes do master mix, qualidade dos primers e sondas e erros de pipetagem (Thermo Fisher Scientific, 2025a; Thermo Fisher Scientific, 2025b). O r^2 calculado para as duas reações também resultou em um valor considerado aceitável. Esse parâmetro indica correlação entre as variáveis e o quão bem um dado explica o outro, ou seja, o quão bem o C_q é capaz de prever a quantidade de cópias na reação. Alguns estudos desenvolveram ensaios de qPCR multiplex para detectar diversos tipos de HPV simultaneamente (JACQUIN *et al.* 2013; ŞAHINER *et al.* 2014). Seria interessante, futuramente, desenvolver uma qPCR duplex para a detecção simultânea dos HPVs 16 e 18. Limitações deste trabalho incluem a falta de testes de especificidade da reação envolvendo o DNA de outros tipos de HPV e a falta de testes de reprodutibilidade. No entanto, futuramente esses testes poderão ser realizados.

Não foi observada diferença significativa entre a prevalência da infecção por HPV entre o grupo controle e o grupo com DII. Vuitton *et al.* (2018) também não observaram diferença entre a prevalência da infecção no grupo com RCU e nos pacientes sem DII testados no estudo. No entanto, os autores observaram diferença significativa entre o grupo DC e os pacientes sem DII, sendo que nos pacientes com DC foi observada maior

prevalência de HPV 16 e outros HPVs de alto risco no canal anal. Já Guzela *et al.* (2022) não encontraram diferença significativa entre o grupo DC e o grupo controle.

A prevalência do DNA dos HPVs investigados foi baixa. Dados da literatura sobre prevalência de infecção pelo HPV em pacientes com DII são muito escassos e a maioria tem foco em pacientes com DC, sendo estudos em pacientes com RCU ainda mais raros. Uma metanálise identificou apenas três estudos que analisaram a prevalência de HPVs de alto risco em pacientes com DII (ALBUQUERQUE *et al.*, 2023). O maior desses, visou estimar a prevalência do HPV em pacientes com doença inflamatória intestinal (VUITTON *et al.*, 2018). Para isso, foram analisadas amostras do canal anal de 101 pacientes com DII, sendo 70 com doença de Crohn. Verificou-se que 34,7% dos pacientes incluídos no estudo apresentaram resultado positivo para infecção por HPV. Porém, a testagem realizada no estudo buscou identificar diversos tipos de HPV, tanto de alto quanto de baixo risco. Quando analisados somente os de alto risco, a prevalência cai para 25,7%. Guzela *et al.* (2022) identificaram infecção por HPV em 27% dos pacientes com DC. Já Cranston *et al.* (2017) encontraram uma prevalência muito alta, de 89,1% dos pacientes com DC e RCU. É difícil comparar os resultados de prevalência desses estudos devido à alta heterogeneidade. Além disso, o método de testagem varia com os estudos, e a escolha da população participante do estudo também tem uma influência significativa nos resultados, considerando fatores como histórico sexual e fatores sociodemográficos, por exemplo (VUITTON *et al.*, 2018). A maioria dos estudos conta com uma população amostral reduzida e muitas vezes não incluem um grupo controle, o que dificulta ainda mais a comparação com a população geral.

É importante ressaltar que o presente trabalho testou amostras clínicas para a detecção de dois tipos de HPV, 16 e 18, que são os HPVs de alto risco mais comumente associados ao câncer. Cerca de 90% dos casos de câncer anal têm como causa a infecção pelo HPV, principalmente o tipo 16 (BUCCHI *et al.*, 2016). Porém, diversos tipos podem estar associados, sendo o tipo 33 o mais comum depois do 16 e do 18 (BRUNI *et al.*, 2023). Sendo assim, existem outros HPVs de alto risco que podem estar presentes nas amostras negativas e que não foram detectados nesse caso.

O fato de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa na infecção pelo HPV entre os grupos DII e controle não exclui a possibilidade de que

pacientes com DII apresentem um risco maior de infecção persistente pelo vírus, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer, especialmente se for considerado o papel do sistema imunológico na eliminação viral. Já foi observado que pacientes com DII parecem ter risco aumentado de câncer anal. Albuquerque *et al.* (2023) verificaram que a incidência de câncer anal em pacientes com RCU é cinco vezes maior do que na população geral e que a incidência em pacientes com DC com envolvimento perianal também é alta.

No entanto, para determinar se a persistência viral é mais comum em pacientes do grupo DII em comparação ao grupo controle, seria necessário haver um acompanhamento desses pacientes para avaliar diferenças na manutenção da infecção e no surgimento de lesões. A razão entre o número de cópias de E2 em relação à E6 pode ser útil em determinar o grau de integração do DNA do HPV ao DNA humano, já que essa razão tende a ser próxima de 1 quando apenas a forma episomal do DNA viral está presente. Porém, são necessários mais estudos para avaliar se a detecção da integração do DNA viral pode ser considerada um biomarcador confiável (SCAGNOLARI *et al.*, 2016).

Apesar de quase todos os pacientes do grupo com DII envolvidos no estudo serem imunossuprimidos por conta do tratamento da doença, a prevalência encontrada foi bem mais baixa do que em outras populações imunossuprimidas. Em um estudo conduzido com mulheres portadoras do vírus HIV, por exemplo, a prevalência do HPV na região anal foi de 78,8% (MARQUES *et al.*, 2021). A prevalência de HPV anal em HSH positivos para HIV também é alta. Um estudo conduzido na China encontrou uma prevalência de 85.1% nessa população (ZHOU *et al.*, 2021). No entanto, a prevalência do HPV em pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos se aproxima mais do encontrado neste trabalho. Albuquerque *et al.* (2020) demonstraram que há uma prevalência de 3,6% de infecção anal pelo HPV 16 nessa população.

Todos os positivos para um dos dois tipos de HPV testados foram do sexo feminino. Esse dado corrobora com os resultados do estudo de Vuitton *et al.* (2018). Os autores observaram que, dos pacientes portadores de DII, positivos para qualquer tipo de HPV, 68,6% eram mulheres e houve uma associação entre ser portador de DC do sexo feminino e uma maior prevalência de infecção por HPV16.

Das amostras vaginais coletadas de pacientes que obtiveram resultado positivo da PCR para infecção anal por HPV, somente uma foi positiva (16,66%). Não é esperado que todos os pacientes com amostras anais positivas também apresentem amostras cervicais positivas. Um estudo mostrou que a detecção concomitante do HPV cervical e anal ocorreu em 42,4% da população do estudo que tinha lesões cervicais. Já nas mulheres do grupo controle, a infecção concomitante foi observada em apenas 8% (SLAMA *et al.*, 2015). Em outro estudo, com mulheres HIV positivas, o DNA do HPV foi encontrado com mais frequência na região anal em comparação com a região vaginal (35,21% e 78,8%, respectivamente) e em 30% das mulheres o DNA viral foi encontrado no ânus e na região cervical (MARQUES *et al.*, 2021). Hernandez *et al.* (2005) observaram que 14% das mulheres saudáveis incluídas no estudo tinham infecção anal pelo HPV, mas não cervical, e que mulheres com HPV cervical possuem um risco elevado de também ter HPV na região anal. O contrário, no entanto, não foi reportado. Os autores também observaram uma concordância entre os tipos de HPV encontrados em amostras vaginais e anais da mesma paciente, o que indica uma fonte comum de infecção. Essa transmissão pode ocorrer tanto pelo contato sexual vaginal e anal com o mesmo parceiro infectado, quanto pela proximidade anatômica entre as regiões. No mesmo estudo, os autores identificaram maior diversidade de tipos de HPV no ânus em comparação com a região cervical. Entre os tipos encontrados, 52% eram HPVs de alto risco. Os tipos de alto risco mais frequentes nas amostras anais positivas foram o HPV 16, o 51 e o 53.

No presente trabalho, foi possível avaliar a carga viral presente nas amostras dos pacientes positivos para o HPV. Poucos estudos avaliaram a carga viral na infecção anal por HPV e os estudos disponíveis apresentam divergências de resultados. Maia *et al.* (2015) relataram que uma alta carga viral em amostras anais está associada com anormalidades citológicas. Já Guerendiain *et al.* (2022), em contraste, observaram uma relação entre alta carga viral e uma melhor sobrevida global. Em amostras cervicais, uma alta carga viral parece estar associada a maior persistência da infecção (MAIA *et al.*, 2015). Kulmala *et al.* (2007) não observaram correlação entre carga viral e a persistência da infecção cervical por HPVs de alto risco. Andersson *et al.* (2005) não observaram correlação entre carga viral e o grau de lesões cervicais. Similar ao observado nesse trabalho, também ocorreu grande variação nos valores de carga viral entre as amostras.

Ylitalo *et al.* (2000) observaram que há associação entre o desenvolvimento de carcinoma cervical e a carga viral alta e persistente do HPV 16. Nesse estudo, cerca de 25% das mulheres com menos de 25 anos que tinham infecção pelo HPV 16 com alta carga viral, desenvolveram câncer dentro de 15 anos.

Estudos que verificaram a carga viral do HPV em amostras anais são muito escassos. Essa questão representa uma lacuna no conhecimento e deve ser melhor investigada e relacionada com dados clínicos dos pacientes, de preferência com pacientes sendo acompanhados por longos períodos. Além disso, a quantificação da carga viral de forma pontual não parece ser um bom preditor do risco de desenvolvimento de câncer, sendo necessários mais estudos que realizem essa quantificação em múltiplos momentos ao longo do tempo (SCAGNOLARI *et al.*, 2016). No entanto, uma das principais limitações desse tipo de estudo é a necessidade de convocar os pacientes para novas coletas de amostra, principalmente os do grupo controle, já que é um procedimento desconfortável. É um desafio captar pacientes para uma coleta, e pode ser ainda mais difícil obter adesão para coletas repetidas.

Dados sobre infecção anal por HPV e dados sobre infecção por HPV na população com DII são muito escassos. É necessário que haja estudos que busquem esclarecer qual a prevalência do vírus nesses pacientes e se há um risco aumentado de progressão das lesões e câncer, para melhor manejo do paciente e melhor direcionamento de medidas profiláticas, como as vacinas. Também é fundamental que diretrizes sejam elaboradas de forma adequada para essa população, levando em conta os riscos específicos a que estão expostas. A detecção do HPV nesses pacientes também é importante para que haja um acompanhamento adequado e para prevenir a evolução de possíveis lesões precursoras para o câncer.

6 CONCLUSÃO

As análises *in silico* para os primers e sondas utilizados apresentaram resultados satisfatórios. O protocolo de extração testado apresentou valores satisfatórios em relação a pureza e quantidade de DNA. Com relação a padronização da reação de qPCR obteve-se valores aceitáveis de eficiência e do coeficiente de correlação, além de alta sensibilidade e especificidade para ambos os tipos de HPV testados. O protocolo foi validado com sucesso em amostras clínicas. A carga viral foi determinada e não foram encontradas diferenças significativas entre valores de carga viral em amostras positivas para HPV 16 e para HPV 18.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Tracey S.; ROGERS, Linda J.; CUELLO, Mauricio A. Cancer of the vagina: 2021 update. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 19-27, out. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9298013>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- ALBUQUERQUE, Andreia *et al.* Burden of anal squamous cell carcinoma, squamous intraepithelial lesions and HPV16 infection in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Transplantation**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 3520-3528, dez. 2020. Disponível em: [https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135\(22\)21632-3/fulltext](https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135(22)21632-3/fulltext). Acesso em: 14 mar. 2025.
- ALBUQUERQUE, Andreia *et al.* Anal High-risk Human Papillomavirus Infection, Squamous Intraepithelial Lesions, and Anal Cancer in Patients with Inflammatory Bowel Disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Crohn's and Colitis**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1228-1234, 17 mar. 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/17/8/1228/7079722>. Acesso em: 14 fev. 2025.
- AMADOR-MOLINA, Alfredo *et al.* Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. **Viruses**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 2624-2642, 28 out. 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/5/11/2624>. Acesso em: 03 fev. 2025.
- ANDERSSON, S *et al.* Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 92, n. 12, p. 2195-2200, jun. 2005. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2361820/>. Acesso em: 14 mar. 2025.
- AUBIN, François *et al.* Genital human Papillomavirus infection in patients with autoimmune inflammatory diseases. **Joint Bone Spine**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 460-465, out. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X11000595>. Acesso em: 13 fev. 2025.
- BANSAL, Anshuma; SINGH, Minip; RAI, Bhavana. Human papillomavirus-associated cancers: a growing global problem. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 84, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4830161/>. Acesso em: 29 jan. 2025.
- BAUMGART, Daniel C.; SANDBORN, William J. Crohn's disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 380, n. 9853, p. 1590-1605, nov. 2012. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60026-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60026-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612600269>. Acesso em: 12 fev. 2025.

BERGVALL, Monika; MELENDY, Thomas; ARCHAMBAULT, Jacques. The E1 proteins. **Virology**, [s. l.], v. 445, n. 1-2, p. 35-56, out. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811109/>. Acesso em: 14 jan. 2024.

BISHOP, Emily E. *et al.* HPV Prevalence in a College-aged Sample Group and its Link to Sexual Behaviors and Attitudes. **Journal of the South Carolina Academy of Science**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 35-40, 2024.

BOWDEN, Sarah J. *et al.* Risk factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: an umbrella review and follow-up mendelian randomisation studies. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 1, 27 jul. 2023. Disponível em: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-023-02965-w>. Acesso em: 14 fev. 2025.

BUCCHI, Dania *et al.* Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: a review. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 33, p. 7415, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5011658/>. Acesso em: 11 fev. 2025.

BURD, Eileen M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1-17, jan. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145302/>. Acesso em: 18 dez. 2023.

BRUNER, Lia Pierson; WHITE, Anna Marie; PROKSELL, Siobhan. Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 411-427, set. 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2023.03.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095454323000362>. Acesso em: 12 fev. 2025.

BRUNI, L *et al.* **ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)**. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. 2023. Disponível em: <https://hpvcentre.net/datastatistics.php>. Acesso em: 10 fev. 2025.

BZHALAVA, Davit; EKLUND, Carina; DILLNER, Joakim. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, [s. l.], v. 476, p. 341-344, fev. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682214005777>. Acesso em: 10 dez. 2023.

CALORE, E. E. *et al.* Anal cytology in patients with AIDS. **Diagnostic Cytopathology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 260-263, 7 out. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dc.21201>. Acesso em: 14 mar. 2025.

CANAVAN, C.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with crohn's disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1097-1104, 30 mar. 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Genital HPV Infection – Basic Fact Sheet**. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>. Acesso em: 10 dez. 2023.

CLAVERO, Omar *et al.* Squamous intraepithelial lesions of the anal squamocolumnar junction: Histopathological classification and HPV genotyping. **Papillomavirus Res**, [s. l.], v. 3, p. 11-17, dec. 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5883205/>. Acesso em: 11 fev. 2025.

COLPANI, Verônica *et al.* Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. e0229154, 21 fev. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0229154>. Acesso em: 11 fev. 2025.

COUKOS, Jennifer; FARRAYE, Francis A. Update on Vaccinating the Patient With Inflammatory Bowel Disease. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 548-560, 6 out. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11938-018-0200-4>. Acesso em: 14 fev. 2025.

CRANSTON, Ross D. *et al.* A Pilot Study of the Prevalence of Anal Human Papillomavirus and Dysplasia in a Cohort of Patients With IBD. **Diseases of The Colon & Rectum**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 1307-1313, dez. 2017. Disponível em: https://journals.lww.com/dcrjournal/abstract/2017/12000/a_pilot_study_of_the_prevalence_of_anal_human.14.aspx. Acesso em: 14 mar. 2025.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. **OpenEpi**: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. 2013. Disponível em: <https://www.openepi.com>. Acesso em: 11 mar. 2025.

DIMAIO, Daniel; PETTI, Lisa M. The E5 proteins. **Virology**, [s. l.], v. 445, n. 1-2, p. 99-114, out. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772959/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

DOORBAR, John. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, [s. l.], v. 445, n. 1-2, p. 80-98, out. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213004108>. Acesso em: 18 dez. 2023.

DREYER, Greta. Clinical implications of the interaction between HPV and HIV infections. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 47, p. 95-106, fev. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693417301293>. Acesso em: 12 fev. 2025.

EBRAHIMI, Fatemeh *et al.* Prevalence of HPV in anal cancer: exploring the role of infection and inflammation. **Infectious Agents and Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 1, 18 dez.

2024. Disponível em:

<https://infectagentscancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13027-024-00624-0>. Acesso em: 14 fev. 2025.

EL-ZEIN, Mariam; RICHARDSON, Lyndsay; FRANCO, Eduardo L. Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: cytology, molecular testing, both or none. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 76, p. 62-68, mar. 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4789074/>. Acesso em: 19 fev. 2025.

EVANDER, M. *et al.* Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 2449-2456, mar. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191355/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

FLYNN, Sean; EISENSTEIN, Samuel. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 1051-1062, dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2019.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039610919300908>. Acesso em: 12 fev. 2025.

FUKUDA, Tomohiro; NAGANUMA, Makoto; KANAI, Takanori. Current new challenges in the management of ulcerative colitis. **Intestinal Research**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 36-44, 30 jan. 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6361009/>. Acesso em: 13 fev. 2025.

GALLO, G. *et al.* Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 532-536, 1 jul. 2003. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1770000/>. Acesso em: 29 jan. 2025.

GARBUGLIA, Anna Rosa *et al.* An anal cancer screening program for MSM in Italy: prevalence of multiple HPV types and vaccine-targeted infections. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 72, p. 49-54, nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665321500668X>. Acesso em: 20 fev. 2025.

GUERENDIAIN, Daniel *et al.* HPV status and HPV16 viral load in anal cancer and its association with clinical outcome. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 4193-4203, 4 jul. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9678095/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

GHEIT, Tarik. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 8 maio 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6517478>. Acesso em: 18 dez. 2023.

GOLDSTONE, Stephen E. Human papillomavirus (HPV) vaccines in adults: learnings from long-term follow-up of quadrivalent hpv vaccine clinical trials. **Human Vaccines &**

Immunotherapeutics, [s. l.], v. 19, n. 1, 2 jan. 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10038021/>. Acesso em: 18 fev. 2025.

GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, [s. l.], v. 131, n. 17, p. 2201-2221, 10 ago. 2017. Disponível em: <https://portlandpress.com/clinsci/article/131/17/2201/71573/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

GUTIÉRREZ-HOYA, Adriana; SOTO-CRUZ, Isabel. NK Cell Regulation in Cervical Cancer and Strategies for Immunotherapy. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3104, 10 nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8619016/>. Acesso em: 8 jan. 2024.

GUZELA, V.R. *et al.* Is there a higher frequency of anal dysplasia and infection by human papillomavirus in Crohn's disease patients? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 55, p. e12141, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/bjmbmr/a/Hx8H7CQhBfmZdQwPKPfNtrv/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

HERNANDEZ, Brenda Y. *et al.* Anal Human Papillomavirus Infection in Women and Its Relationship with Cervical Infection. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 2550-2556, 1 nov. 2005. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1475824/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Current ICTV Taxonomy Release**. 2024. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 14 jan. 2024.
International Human Papillomavirus Reference Center (IHRC). **HPV reference clones**. 2023. Disponível em: https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/. Acesso em: 5 jan. 2024.

IRWIN, James *et al.* A rolling phenotype in Crohn's disease. **Plos One**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0174954, 6 abr. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0174954>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174954>. Acesso em: 12 fev. 2025.

JACOBSON, Denise L. *et al.* Immunogenicity and Tolerability to Human Papillomavirus-like Particle Vaccine in Girls and Young Women with Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1441-1449, jun. 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3677764/>. Acesso em: 18 fev. 2025.
JACQUIN, Elise *et al.* Real-time duplex PCR for simultaneous HPV 16 and HPV 18 DNA quantitation. **Journal Of Virological Methods**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 498-502, nov. 2013.

JAIN, Manisha A.; LIMAIE, Faten. Cervical Squamous Cell Carcinoma. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559075/>. Acesso em: 07 fev. 2025.

KADAJA, Meelis *et al.* Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. **Virology**, [s. l.], v. 384, n. 2, p. 360-368, fev. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208007691>. Acesso em: 15 jan. 2024.

KANEDA, Tokinobu *et al.* Multiple Skin Cancers in a Renal Transplant Recipient: A Patient Report with Analyses of Human Papillomavirus and Human Polyomavirus Infection. **Yonago Acta Med.**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 145-150, 14 out. 2015. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4626361/>. Acesso em: 11 fev. 2025.

KIRNBAUER, R *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 67, n. 12, p. 6929-6936, dez. 1993. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC238150/>. Acesso em: 17 fev. 2025.

KOSHIOL, J. *et al.* Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 168, n. 2, p. 123-137, 15 maio 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article/168/2/123/100517>. Acesso em: 06 fev. 2025.

KREIJNE, J. E. *et al.* Cumulative exposure to immunomodulators increases risk of cervical neoplasia in women with inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 207-217, 23 maio 2023.

KRZOWSKA-FIRYCH, Joanna *et al.* An overview of Human Papillomavirus (HPV) as an etiological factor of the anal cancer. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-6, jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034118301011>. Acesso em: 12 dez. 2023.

KUCHARZIK, T *et al.* ECCO Guidelines on the Prevention, Diagnosis, and Management of Infections in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 879-913, 17 mar. 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/15/6/879/6175313>. Acesso em: 17 fev. 2025.

KULMALA, Satu-Maria A. *et al.* Type-Specific Persistence of High-Risk Human Papillomavirus Infections in the New Independent States of the former Soviet Union Cohort Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 17-22, 1 jan. 2007. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/16/1/17/276683/Type-Specific-Persistence-of-High-Risk-Human>. Acesso em: 14 mar. 2025.

KUSAKABE, Misako *et al.* Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 965-974, 9 jun. 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10390372/>. Acesso em: 06 fev. 2025.

LEBRETON, M. *et al.* Vulvar intraepithelial neoplasia: classification, epidemiology, diagnosis, and management. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 101801, nov. 2020.

LETO, Maria das Graças Pereira *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 306-317, abr. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/W8xQS6MSSk7tT8CLRCnbs8f/#>. Acesso em: 18 dez. 2023.

LONGWORTH, Michelle S.; LAIMINS, Laimonis A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 362-372, jun. 2004. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC419925/>. Acesso em: 28 jan. 2025.

LU, Junling; LI, Ya; WANG, Jun. Small Cell (Neuroendocrine) Carcinoma of the Cervix: an analysis for 19 cases and literature review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 916506, 13 jul. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9326003/>. Acesso em: 29 jan. 2024.
MAIA, L. B. *et al.* HPV load and anal cytological abnormalities. **HIV Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 467-470, 6 set. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hiv.12317>. Acesso em: 14 mar. 2025.

MARQUES, Marcos Paulo Cardoso *et al.* Differences in HPV infection and HPV-related lesions between the cervix and anus in HIV-positive women. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 229-234, 29 set. 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/43354/25139>. Acesso em: 14 mar. 2025.

MAUL, G. G. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. **Bioessays**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 660-667, ago. 1998. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8%3C660::AID-BIES9%3E3.0.CO;2-M](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8%3C660::AID-BIES9%3E3.0.CO;2-M). Acesso em: 28 jan. 2025.

MEYERS, J. *et al.* Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1546-1550, 4 fev. 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4019329/>. Acesso em: 25 jan. 2025.

Ministério da Saúde. **Nota técnica nº 41/2024**. Atualização das recomendações da vacinação contra HPV no Brasil. 02 abr. 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2024/nota-tecnica-no-41-2024-cgici-dpni-svsa-ms>. Acesso em: 17 fev. 2025.

Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde incorpora teste inovador para detecção do HPV em mulheres**. 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt->

br/assuntos/noticias/2024/marco/ministerio-da-saude-incorpora-teste-inovador-para-deteccao-do-hpv-em-mulheres. Acesso em: 20 fev. 2025.

Ministério da Saúde. **Coortes Vacinais - Papilomavírus Humano (HPV)**. 2025.

Disponível em:

https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_VACINACAO_HP/SEIDIGI_DEMAS_VACINACAO_HP.html. Acesso em: 18 fev. 2025.

MOLIJN, Anco *et al.* Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.

Journal of Clinical Virology, [s. l.], v. 32, p. 43-51, mar. 2005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653204003622>. Acesso em: 12 mar. 2025.

MORGANTE, Carolina Vianna; BLAWID, Rosana. **Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real**: princípios e fundamentos. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1066218/1/SDC278.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2025.

NADAL, Luis Roberto *et al.* Comparison between anal cytology, high-resolution

anoscopy and HPV DNA genotyping by polymerase chain reaction in the post-treatment follow-up of condylomata acuminata. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [s. l.], v. 47, 2020. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rcbc/a/VnMGjbrWrL9XhYTtMCrjKh/>. Acesso em: 19 fev. 2025.

NAIAR, Ritu; WILBUR, David C. (ed.). **The Bethesda system for reporting cervical cytology**: definitions, criteria, and explanatory notes. 3. ed. Cham: Springer, 2015.

NG, Siew C *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10114, p. 2769-2778, 23 dez. 2017. Disponível em:

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)32448-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)32448-0/fulltext). Acesso em: 13 fev. 2025.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Cervical cancer**. 2023. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. Acesso em: 18 dez. 2023.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **HPV e câncer do colo do útero**.

2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em: 12 dez. 2023.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Vacina contra papilomavírus**

humano (HPV). 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/vacina-contravirus-do-papiloma-humano-hpv>. Acesso em: 18 fev. 2025.

PALEFSKY, Joel M. *et al.* HPV Vaccine against Anal HPV Infection and Anal Intraepithelial Neoplasia. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 365, n. 17, p. 1576-1585, 27 out. 2011. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1010971>. Acesso em: 11 fev. 2025.

PAPPA, Kalliopi *et al.* Novel structural approaches concerning HPV proteins: insight into targeted therapies for cervical cancer (review). **Oncology Reports**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1547-1554, abr. 2018. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6257>. Acesso em: 8 jan. 2023.

PARK, Kay J. Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification. **Histopathology**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 112-127, 17 dez. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/his.13995>. Acesso em: 29 jan. 2025.

PETCA, Aida *et al.* Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1-1, 13 out. 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7579832/>. Acesso em: 25 jan. 2025.

PÉREZ-GONZÁLEZ, Alexandre *et al.* Update on the Epidemiological Features and Clinical Implications of Human Papillomavirus Infection (HPV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) Coinfection. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1047, 18 maio 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9147826/>. Acesso em: 11 fev. 2025.

PITTET, Laure F. *et al.* Risk of Vaccine-Preventable Infections in Swiss Adults with Inflammatory Bowel Disease. **Digestion**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 956-964, 2021. Disponível em: <https://karger.com/dig/article/102/6/956/828008/Risk-of-Vaccine-Preventable-Infections-in-Swiss>. Acesso em: 17 fev. 2025.

RAJARAM, Shalini; GUPTA, Bindiya. Screening for cervical cancer Choices & dilemmas. **Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 2, n. 154, p. 210-220, ago. 2021. Disponível em: https://journals.lww.com/ijmr/fulltext/2021/08000/screening_for_cervical_cancer__choices___dilemmas.6.aspx. Acesso em: 18 fev. 2025.

REBOLJ, Matejka *et al.* Extension of cervical screening intervals with primary human papillomavirus testing: observational study of English screening pilot data. **BMJ**, [s. l.], 31 maio 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9153243/>. Acesso em: 19 fev. 2025.

RUNGOE, Christine *et al.* Inflammatory Bowel Disease and Cervical Neoplasia: a population-based nationwide cohort study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 693-700, abr. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356514010817>. Acesso em: 13 fev. 2025.

RYNDOCK, Eric J.; MEYERS, Craig. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1165-1170, 9 set. 2014. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2014.959497>. Acesso em: 25 jan. 2025.

SABATINI, Maria Elisa; CHIOCCA, Susanna. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 306-314, 11 nov. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-019-0602-7>. Acesso em: 09 dez. 2023.

ŞAHINER, Fatih *et al.* Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 97, p. 44-50, fev. 2014.

SAIRENJI, Tomoko; COLLINS, Kimberly L.; EVANS, David V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 673-692, dez. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2017.07.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0095454317301045>. Acesso em: 12 fev. 2025.

SALIT, Irving E. *et al.* Screening for HIV-Associated Anal Cancer: correlation of HPV genotypes, p16, and E6 transcripts with anal pathology. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 1986-1992, 1 jul. 2009. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/18/7/1986/164071/Screening-for-HIV-Associated-Anal-Cancer>. Acesso em: 14 mar. 2025.

SAPP, Martin; BIENKOWSKA-HABA, Malgorzata. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. **The Febs Journal**, [s. l.], v. 276, n. 24, p. 7206-7216, 27 nov. 2009. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>. Acesso em: 17 jan. 2024.

SCAGNOLARI, Carolina. Consolidation of molecular testing in clinical virology. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 387-400, 24 dez. 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/10.1080/14787210.2017.1271711>. Acesso em: 19 fev. 2025.

SCHMITZ, Martina *et al.* **Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types**. *Journal of Clinical Virology*, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 302-307, abr. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653209000389>. Acesso em: 07 mar. 2025.

SELLORS, J.W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual**. Lyon: International Agency for

Research on Cancer, 2003. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=1>. Acesso em: 11 fev. 2025.

SHAH, Shamita B. *et al.* Prevalence of Anal Dysplasia in Patients With Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1955-1961, nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356515007661>. Acesso em: 13 fev. 2025.

SLAMA, J. *et al.* Impact of risk factors on prevalence of anal HPV infection in women with simultaneous cervical lesion. **Neoplasma**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 308-314, 2015.

STANLEY, Margaret. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 5-10, maio 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825810000879>. Acesso em: 29 jan. 2025.

STIER, Elizabeth A. *et al.* International Anal Neoplasia Society's consensus guidelines for anal cancer screening. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 154, n. 10, p. 1694-1702, 31 jan. 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.34850>. Acesso em: 20 fev. 2025.

TAYLOR, Sean C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 761-774, jul. 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(18\)30342-1](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(18)30342-1). Acesso em: 20 fev. 2025.

Thermo Fisher Scientific. **Real-Time PCR: Understanding Ct**. 2025a. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>. Acesso em: 06 mar. 2025.

Thermo Fisher Scientific. **Poor Efficiency of PCR**. 2025b. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>. Acesso em: 06 mar. 2025.

THOMAS, Anita *et al.* Penile cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 7, n. 1, 11 fev. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00246-5>. Acesso em: 12 dez. 2023.

UniProt Consortium. E1 - Replication protein E1 - Human papillomavirus type 16. **UniProt**. 2025a. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03114/entry>. Acesso em 15 jan. 2025.

UniProt Consortium. E2 - Regulatory protein E2 - Human papillomavirus type 16. **UniProt**. 2025b. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03120/entry>. Acesso em 15 jan. 2025.

UniProt Consortium. E4 - Protein E4 - Human papillomavirus type 16. **UniProt**. 2025c. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06922/entry>. Acesso em 20 jan. 2025.

UniProt Consortium. E5 - Probable protein E5 - Human papillomavirus type 16. **UniProt**. 2025d. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06927/entry>. Acesso em 20 jan. 2025.

UniProt Consortium. E7 - Protein E7 - Human papillomavirus type 16. **UniProt**. 2025e. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P03129/entry>. Acesso em 20 jan. 2025.

VALADÃO, Marcus *et al.* Brazilian Society of Surgical Oncology: guidelines for the management of anal canal cancer. **Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 810-829, 6 abr. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jso.27269>. Acesso em: 11 fev. 2025.

VAN DOORSLAER, Koenraad *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: papillomaviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 99, n. 8, p. 989-990, 1 ago. 2018. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001105>. Acesso em: 10 dez. 2023.

VILLIERS, Ethel-Michele de *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, [s. l.], v. 324, n. 1, p. 17-27, jun. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268220400220X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dez. 2023.

VUITTON, Lucine *et al.* High Prevalence of Anal Canal High-Risk Human Papillomavirus Infection in Patients With Crohn's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1768-1776, nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356518302635>. Acesso em: 14 fev. 2025.

VUYST, Hugo de *et al.* Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 27 jan. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.24116>. Acesso em: 20 fev. 2025.

WANG, Joshua W.; RODEN, Richard B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, [s. l.], v. 445, n. 1-2, p. 175-186, out. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3770800/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

WESTRICH, Joseph A.; WARREN, Cody J.; PYEON, Dohun. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus Research**, [s. l.], v. 231, p. 21-33, mar. 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5325784/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

WILEY, Dorothy Joann *et al.* Comparison of 2 Anal Cytology Protocols to Predict High-Grade Anal Intraepithelial Neoplasia. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 414-424, out. 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3788863/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

WILLIAMSON, Anna-Lise. Recent Developments in Human Papillomavirus (HPV) Vaccinology. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1440, 26 jun. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/7/1440>. Acesso em: 17 fev. 2025.

WOODMAN, Ciaran B. J.; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 7, p. 11-22, jan. 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc2050>. Acesso em: 13 fev. 2025.

XUE, Jisen *et al.* Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 297-306, 26 dez. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.1279>. Acesso em: 29 jan. 2025.

YANG, Eric J *et al.* Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in hpv-related cancer risk. **Modern Pathology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 994-1000, jul. 2015. Disponível em: [https://www.modernpathology.org/article/S0893-3952\(22\)01407-7/fulltext](https://www.modernpathology.org/article/S0893-3952(22)01407-7/fulltext). Acesso em: 28 jan. 2025.

YLITALO, Nathalie *et al.* Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. **The Lancet**, [s. l.], v. 355, n. 9222, p. 2194-2198, jun. 2000. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(00\)02402-8/](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(00)02402-8/). Acesso em: 14 mar. 2025.

ZHOU, Yiguo *et al.* Human papillomavirus prevalence among men who have sex with men in China: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1357-1367, 25 mar. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-021-04229-y>. Acesso em: 14 mar. 2025.

ZUR HAUSEN, Harald *et al.* Human Papillomaviruses and Their Possible Role in Squamous Cell Carcinomas. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [s. l.], p. 1-30, 1977.

APÊNDICE A – Procedimento operacional padrão relativo à coleta, transporte e armazenamento das amostras clínicas

1. Objetivo: Orientar e padronizar a coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas humanas de swab da região anogenital.

2. Material Necessário

- 5.1 Tubo Falcon de 15 mL
- 5.2 Cytobrush estéril
- 5.3 Caixa térmica 8.5L
- 5.4 Rack para tubos de 15 mL
- 5.5 Gelo reciclável de 500 mL
- 5.6 Solução tampão PBS
- 5.7 Etiquetas para identificação das amostras

3. Descrição do Procedimento

Procedimento de coleta:

- Introduzir o cytobrush até quatro centímetros da margem anal;
- Realizar cinco movimentos de rotação.
- Inserir o cytobrush com a amostra no tubo falcon contendo tampão PBS;

Armazenamento e transporte:

- Manter sob refrigeração por no máximo 4 horas ou transportar imediatamente para o laboratório;
- As amostras devem ser acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável para o transporte até o laboratório;
- Após a chegada no laboratório, as amostras devem ser armazenadas em freezer -80 °C até o momento de serem submetidas a extração de DNA.

APÊNDICE B – Artigo submetido – Respiratory Viruses’ circulation during pandemic: why is rhinovirus so “tough guy”?

Brazilian Journal of Microbiology

Respiratory viruses’ circulation during pandemic: why is rhinovirus so “tough guy”?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Respiratory viruses’ circulation during pandemic: why is rhinovirus so “tough guy”?
Article Type:	Review
Section/Category:	Medicine and Public Health
Funding Information:	
Abstract:	A few months after the beginning of the COVID-19 pandemic in March 2020, several non-pharmacological measures were adopted worldwide, with varying degrees of strictness, to contain the transmission of the virus and mitigate its impacts. These measures, in addition to effectively reducing the circulation of SARS-CoV-2, also appeared to impact the circulation of other respiratory viruses. Therefore, this study aims to discuss the most relevant data available regarding the circulation of the major respiratory viruses during the COVID-19 pandemic, exploring the factors that allowed some viruses to continue circulating while others experienced a decline. Several authors report that the detection of influenza, respiratory syncytial virus (RSV), human coronaviruses (hCoVs), human parainfluenza viruses (HPIVs), and human metapneumovirus (hMPV) dropped significantly. However, non-enveloped viruses such as adenovirus, and especially human rhinovirus (HRV), did not seem to be as affected. Hypotheses for this scenario include the adoption of non-pharmacological measures to curb the spread of COVID-19, behavioral changes in hygiene habits, intrinsic characteristics of each virus such as transmission mode, the presence or absence of a viral envelope and viral interference. Rhinovirus is particularly intriguing, as it maintained a high prevalence during the years of the pandemic. Further investigation into the possible explanations for this phenomenon may be worthwhile.
Corresponding Author:	Aripuana Watanabe Universidade Federal de Juiz de Fora BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Juiz de Fora
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Eva Maria de Assis Carvalho
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Eva Maria de Assis Carvalho Katia Ozanic Alessandra Ferreira Barbosa Machado Vanessa Cordeiro Dias Claudio Galuppo Diniz Vania Lucia da Silva Nancy Bellei Aripuana Watanabe
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Juiz de Fora, October 23, 2024 Dear Luís Augusto Nero,, PhD, Editors-in-Chief Brazilian Journal of Microbiology

	Please find enclosed the manuscript Respiratory viruses' circulation during pandemic: why is rhinovirus so "tough guy"? for submission to Brazilian Journal of Microbiology. This material is original, is not currently under consideration nor has been accepted for publication elsewhere and all authors have read the manuscript and approve its submission. The authors declare no conflict of interest. I would like to point out that the editor-in-chief, Luís Augusto Nero, has approved the submission of the review. Aripuana Watanabe
--	--

Respiratory viruses' circulation during pandemic: why is rhinovirus so "tough guy"?

Eva Maria de Assis Carvalho: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0009-0005-4729-5664

Katia Ozanic: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Alessandra Ferreira Barbosa Machado: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0000-0003-3972-7576

Vanessa Cordeiro Dias: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0000-0001-7681-3268

Claudio Galuppo Diniz: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0000-0001-7681-3268

Vania Lucia da Silva: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0000-0002-3682-9035

Nancy Bellei: Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. ORCID: 0000-0001-6080-5693

Aripuanã Watanabe: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ORCID: 0000-0003-0875-2269

Corresponding author: Aripuanã Watanabe (aripuan.watanabe@ufjf.br)

Acknowledgments: Authors would like to acknowledge the Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGCBIO) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Contributions

Conceptualization: Eva Maria de Assis Carvalho, Aripuanã Watanabe; Literature search and data analysis: Eva Maria de Assis Carvalho, Aripuanã Watanabe; Writing - original draft preparation: Eva Maria de Assis Carvalho; Writing - review and editing: Eva Maria de Assis Carvalho, Aripuanã Watanabe; Supervision: Aripuanã Watanabe; Critically revised the work: Katia Ozanic, Nancy Bellei, Vânia Lúcia da Silva, Cláudio Galuppo Diniz, Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Vanessa Cordeiro Dias.

Abstract

A few months after the beginning of the COVID-19 pandemic in March 2020, several non-pharmacological measures were adopted worldwide, with varying degrees of strictness, to contain the transmission of the virus and mitigate its impacts. These measures, in addition to effectively reducing the circulation of SARS-CoV-2, also appeared to impact the circulation of other respiratory viruses. Therefore, this study aims to discuss the most relevant data available regarding the circulation of the major respiratory viruses during the COVID-19 pandemic, exploring the factors that allowed some viruses to continue circulating while others experienced a decline. Several authors report that the detection of influenza, respiratory syncytial virus (RSV), human coronaviruses (hCoVs), human parainfluenza viruses (HPIVs), and human metapneumovirus (hMPV) dropped significantly. However, non-enveloped viruses such as adenovirus, and especially human rhinovirus (HRV), did not seem to be as affected. Hypotheses for this scenario include the adoption of non-pharmacological measures to curb the spread of COVID-19, behavioral changes in hygiene habits, intrinsic characteristics of each virus such as transmission mode, the presence or absence of a viral envelope and viral interference. Rhinovirus is particularly intriguing, as it maintained a high prevalence during the years of the pandemic. Further investigation into the possible explanations for this phenomenon may be worthwhile.

Keywords: Review; Respiratory viral infections; Influenza; Respiratory syncytial virus; Occurrence.

Competing interests: The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

Introduction

At the end of 2019, a previously unknown coronavirus was identified as causing severe acute respiratory syndrome (SARS) in several patients in Wuhan, Hubei province, China. Later named SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), the virus spread worldwide and the associated disease was named COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). In March 2020, the World Health Organization (WHO) declared a pandemic caused by SARS-CoV-2. Since then, several measures have been implemented around the world with the aim of containing the transmission of the virus and mitigating its impacts. These measures consisted of closing non-essential services, social distancing, closing borders and the use of facial masks, as the virus is mainly transmitted through saliva droplets and aerosols [1]. To date, COVID-19 has caused more than seven million deaths worldwide [2] and has directly impacted health systems, the movement of people and the global economy.

SARS-CoV-2 is a virus of the *Betacoronavirus* genus, belonging to the *Coronaviridae* family [3]. The name of the family is derived from the crown-like appearance created by the spike projections on the surface of the virion, when observed by electron microscopy [4]. It is an enveloped, spherical virus, with a diameter ranging between 60 and 140nm [5]. SARS-CoV-2 has single-stranded ribonucleic acid with positive polarity (ssRNA+) as its genetic material, with a genome of approximately 30 thousand base pairs [6].

Many non-pharmacological measures were adopted throughout the pandemic, such as facial mask use, social distancing, closing schools and universities, canceling events and closing borders, with a varying degree of strictness depending on the country. These measures, in addition to being effective in containing the spread of SARS-CoV-2, also impacted the circulation of other respiratory viruses, with a lower-than-expected prevalence being observed in this period for many of these viruses [7-10].

In general, the occurrence of respiratory viruses infections follows a seasonal pattern, especially in places with a temperate climate. Influenza (IFV) infections, for example, are more frequent in winter, while the human rhinovirus (HRV) generally circulates throughout the entire year [11]. Nevertheless, there appears to have been a change in this pattern during the pandemic. Nagakubo et al. [12] observed a shift in the detection rates of respiratory viruses after the start of the pandemic, between June 2020 and February 2021 a drop in the variety of respiratory viruses was detected. During this period, the most frequently found viruses were HRV and adenoviruses (AdV), in addition to SARS-CoV-2.

Infections caused by viruses that infect the respiratory tract are common and, normally, there are no measures to prevent these infections from happening [13], with the exception of IFV and respiratory syncytial virus (RSV), for which vaccines are available. Furthermore, antiviral drugs are available for the treatment of the flu. The degree and duration of the impact of measures adopted against SARS-CoV-2 on the circulation of other respiratory viruses varied according to the type of virus. Some showed a sharp drop in the number of detections and remained that way, others appear not to have been affected and even showed an increase in circulation [14], as we will discuss in more detail further. In this sense, the objective of this review is to discuss the most relevant data available related to the circulation of the main respiratory viruses during the COVID-19 pandemic, exploring the factors that allowed the circulation of some viruses while others underwent a decline in circulation, and the impact of the non-pharmacological measures adopted.

Prevalence of non-SARS-CoV-2 respiratory viruses before and during the COVID-19 pandemic

Before the onset of the pandemic caused by SARS-CoV-2, the most frequently encountered respiratory viruses in the population were IFV, parainfluenza viruses (hPIVs), seasonal human coronaviruses (hCoVs), HRV, adenovirus, RSV, and human metapneumovirus (hMPV) [15]. Some of these respiratory viruses, such as IFV, RSV, and other hCoVs, exhibited a well-established seasonal pattern before the pandemic, with peaks during the winter months [13, 16-18]. On the other hand, viruses like rhinovirus, adenovirus, parainfluenza, and metapneumovirus circulated throughout the year, although there was an increase in detections during certain periods of the year [13, 19-22].

It was noted that the distribution and incidence patterns of several respiratory viruses underwent significant changes during the COVID-19 pandemic, with these variations being more evident among enveloped viruses than among non-enveloped viruses [23].

Influenza

Influenza viruses are the causative agents of the flu, an acute respiratory tract infection that affects approximately 1 billion people worldwide annually [24]. They belong to the *Orthomyxoviridae* family and are divided into four genera: *Alphainfluenzavirus* (Influenza A), *Betainfluenzavirus* (Influenza B), *Gammainfluenzavirus* (Influenza C), and *Deltainfluenzavirus* (Influenza D) [25]. However, only the first two are of clinical importance to humans, with influenza A viruses being responsible for causing pandemics [26]. Influenza are enveloped viruses, with helical capsid symmetry and single-stranded segmented RNA with negative polarity [27]. Influenza A viruses are divided into subtypes according to the type of Hemagglutinin and Neuraminidase, two glycoproteins, which they present in their viral envelope. Due to the segmented genome, there may be gene segments exchange, which generates new viral subtypes. Influenza B is not divided into subtypes, but into two lineages: Victoria and Yamagata. Transmission of the influenza virus can occur from person to person through saliva droplets or, less frequently, through contact with contaminated surfaces [26]. Influenza viruses have a global distribution and an annual circulation pattern, with peaks in the winter months, between December and February, in the northern hemisphere [13]. In the Southern Hemisphere, there is generally an increase in the incidence of influenza cases between the months of May and October [17].

Following the beginning of the COVID-19 pandemic, the virus' major circulation time has become more unpredictable [26] and several studies show that there was a sudden drop in infection cases after the start of the pandemic.

Northern Hemisphere

In a study conducted in China, Ye and Wang [28] reported a significant reduction in positive tests for influenza A and influenza B in 2020, in comparison to the previous year, as well as a decrease in occurrence of co-infections. Park, Michelow and Choe [29], using data from epidemiological surveillance in South Korea, compared the incidence of several respiratory viruses between 2016 and 2019 with the first year of the pandemic, in the adult and pediatric population, and in hospitalized and non-hospitalized patients. After the implementation of social distancing measures, a significant reduction in monthly

influenza detections was perceived, ranging from 98.5% to 100% from March 2020, compared to previous years, in hospitalized patients. In non-hospitalized patients, there was a 63.1% to 99% reduction in monthly detections.

A study from Japan [30] observed a reduced frequency of influenza in all age groups after the onset of the COVID-19 pandemic, when compared to the previous two years (2018-2019). A retrospective study carried out in Italy, which included around 12 thousand hospitalized adult patients, collected data from detection tests for SARS-CoV-2 and other respiratory viruses in the period before the COVID-19 pandemic (January 2017 until February 2020) and after the start of the pandemic (March 2020 until May 2021). The authors show a drastic decline in cases of influenza A and B during the pandemic period compared to previous years, with only four cases diagnosed. Furthermore, the authors were unable to observe the virus seasonal circulation pattern during the winter of 2021 [13].

In Canada, a significant reduction in Influenza activity was also observed [31]. The authors compared the number of positive tests from August 2018 to December 2021, considering influenza season ranging between November to the end of April. Influenza peaks were observed from November to February during the 2018–2019 and 2019–2020 winter seasons, however, after March 2020, there was a noticeable absence of viral respiratory illnesses, including throughout the typical 2020–2021 flu season and there was no influenza detection from the beginning of the COVID-19 pandemics onwards.

Smedberg et al. [32], in the USA, analyzed the positive test results for the detection of various respiratory viruses from January 15th to April 15th in 2019, 2020, and 2021. There was no Influenza virus detected in the months studied in 2021. In the same period in 2019 and 2020, the number of positive tests for influenza A and B was higher than in 2021. However, detections in 2020 were lower than in 2019 for IFV-A.

A later study, conducted by Eldesouki, Uhteg and Mostafa [33], also in the USA, aimed to see the impact of the Omicron variant of SARS-CoV-2 on the circulation of other respiratory viruses between November 2021 to February 2022. They observed an increased positivity for influenza A in December 2021 (from 0.72% in November, 2021 to 2.98% in December, 2021) that remained at nearly the same level in the next months or slightly decreased in February 2022, coinciding with the substantial growth in SARS-CoV-2 positivity. In this period, few cases of influenza B were detected (0.01%), with no cases recorded in January 2022.

Southern Hemisphere

A pioneer study performed in Brazil compared the detection rates of influenza A and B during the 11th to 16th epidemiological weeks of 2020 with those of the previous four years. No cases of influenza A were detected and only four samples tested positive for influenza B, representing 1.64% of all samples, which was significantly lower compared to the same period in previous years [34]. Another study from Western Australia analyzed weekly detections of the influenza virus in the pediatric population during the winter of 2020 and compared them with detections from the previous eight winters [35]. The authors noted that before the implementation of local COVID-19 restrictions, in the first months of 2020, the number of influenza detections remained similar to those found in previous years. However, after measures were introduced, a decrease of almost 100% in influenza detections was observed, with the rate of positive tests being very low (0.03%). From the end of April 2020, there was a gradual lifting of many restrictions and

reopening of schools, however this did not reflect an increase in influenza cases, which practically disappeared during the months observed. These results were similar to those reported by Sullivan et al. [36] and Abo et al. [17], also in Australia, who observed that the removal of restrictive measures did not lead to an increase in influenza cases during the typical flu season.

Abo et al. [17] compared the prevalence of respiratory virus infections in children between two periods: from 2015 to 2019 and during 2020. In 2020, a 77.3% reduction in the proportion of positive tests for influenza A and an 89.4% reduction for influenza B was observed, compared to previous years. After the 14th week there was no detection of influenza A and none of influenza B after the 17th week, also coinciding with implementation of restrictive measures. Similarly, Tempia et al. [37] also noticed a decrease of influenza virus detections in 2020, in South Africa, with no increase being seen with the easing of measures against COVID-19, contrary to what was observed for RSV in the same study. Varela et al. [38], in Brazil, tested samples from over a thousand patients for SARS-CoV-2, influenza A and B during the autumn and winter months of 2020, of which 32.7% were positive for SARS-CoV-2 and none was positive for influenza, which was unexpected, considering that this was exactly the period when a peak in cases was anticipated.

Summarily, a drop in influenza detections was reported by several studies globally, and influenza viruses essentially disappeared during the pandemic period. Influenza viruses have a similar mode of transmission to SARS-CoV-2, so non-pharmacological measures aimed at containing the coronavirus may have contributed to the decrease in detections. A study showed that the use of surgical masks considerably reduces detections of influenza in respiratory droplets [39]. It is possible that even after the most restrictive measures were lifted, simpler measures such as wearing a mask and hand hygiene (which, in general, were maintained, or at least encouraged), may have kept circulation low, or non-existent, as in some cases. The lack of local reservoirs following the lifting of these stricter measures may also have contributed to detections remaining low [35]. It is interesting to point out that there was a progressive decrease in Influenza B Yamagata variant detections globally from 2020 onwards and this lineage was probably extinct [40].

Respiratory Syncytial Virus

The RSV belongs to the *Pneumoviridae* family, which causes cold-like symptoms in most people, but can pose a serious risk to children, the elderly and immunocompromised people [25,41,42]. It is an enveloped virus, with single-stranded RNA, negative polarity and non-segmented genome [43]. RSV is the main cause of respiratory tract infection in children and is associated with high mortality in this group, being the main cause of hospitalizations for bronchiolitis, in addition to being the primary cause of pneumonia in children [17,41,44]. Transmission of the virus occurs through droplets of respiratory secretions or fomites [42]. Before the COVID-19 pandemic, RSV had a seasonal circulation pattern, varying between countries. In the northern hemisphere, peaks in virus infections generally occur in the winter months, between December and February. In the Southern Hemisphere, the virus circulates to a greater extent in the autumn months, between April and June [16-18]. The RSV seasonal circulation pattern appears to have changed after the start of the pandemic, when a reduction in detections of the virus began to be observed, akin to the influenza virus [14,45,46].

Northern Hemisphere

According to a multicenter spanish study, there was a 65.9% reduction in RSV diagnoses and a 40% reduction in pediatric emergency visits in the first year of the pandemic, compared to the previous four years. There was also a decrease in child hospitalizations for bronchiolitis. Most of the diagnoses occurred in the first months of 2020, when many of the non-pharmacological measures were not yet in place. From May 2020 onwards, there was no detection of the virus, which reemerged only at the end of the year. However, even at the end of 2020, a period in which an increase in the number of cases in the country was expected, due to the beginning of winter and the relaxation of some non-pharmacological measures, detections were still very low [18]. One possibility raised by the authors to explain the reason for the lack of detections would be that SARS-CoV-2 may have occupied the ecological niche previously occupied by other respiratory viruses, including RSV.

A south korean study observed a significant reduction, ranging from 82.1% to 100%, in monthly RSV detections in hospitalized patients in March 2020 when compared to the data for 2016 to 2019. In non-hospitalized patients, there was a 68.5% to 99.9% reduction in monthly detections [29].

Olsen et al. [14] observed that the weekly detections of RSV dropped drastically from January (15.3%) to April 2020 (1.4%) in the United States, and remained at very low levels until April, 2021, when the detections started to rise again, out of season, since peaks occurred in the previous four years from October to late December. In Canada, Heiskanen et al. [31] observed an absence of RSV in season 2020-2021, between November and February, the typical season of circulation of this virus in the country. RSV cases only started to rise again at the end of 2021. A significant reduction in RSV cases was also observed in Japan after the beginning of the pandemic compared with the two previous years, and, after May 2020, RSV was not detected in any samples [30].

Francesco et al. [13] compared the prevalence in Italy of several respiratory viruses, including RSV, between March 2020 and May 2021, with their prevalence in the three years prior to the pandemic and RSV was not detected in any samples after March 2020. In China, a study conducted by Ye and Wang [28], focused on the child population, compared the detection rates of some respiratory viruses from January 2019 until December 2020 and they observed that the positive rates of all viruses, including RSV, were lower in 2020 compared to 2019 and there was no change in the RSV seasonality.

Southern Hemisphere

An abrupt decrease in RSV detections was observed in Australia after restrictive measures were implemented [17,35]. RSV was still present in 2020, during the first lockdown, contrary to what was observed for the influenza virus. However, it was circulating at much lower levels than in previous years (68.6% reduction detections compared to the period of 2015 to 2019) and, after the enactment of more stringent COVID-19 containment measures, such as curfews, daycare centers closures and adoption of non-presential classes in schools and universities, RSV was no longer detected [17]. However, the authors discuss that a reduction in circulation of respiratory viruses also occurred in other places where less restrictive measures were adopted. In contrast, Yeoh et al. [35] described a situation similar to that of influenza, i.e., the detections of RSV at the beginning of 2020 were similar to the detections for the same

period in previous years, nevertheless, from the moment the restrictive measures were implemented, there was a 98% decrease in RSV detections.

Similarly to the results of Torres-Fernandez et al. [18], in Spain, Friedrich et al. [47] also observed an abrupt reduction in hospitalizations of children under one year old for bronchiolitis in Brazil in 2020, attributing this decrease to the pandemic containment measures adopted in the country.

Another study, conducted in South Africa, evaluated surveillance data for RSV detection in the adult and child population between January and October 2020 and compared it with data from 2013 to 2019 [37]. A decrease in RSV detection was observed between the 14th week and the 22nd week of 2020, precisely when COVID-19 containment measures were implemented. However, an increase in virus detections was observed after the 29th week, in late spring and early summer, which, nevertheless, was not the typical time of year for a spike in RSV infections. An increase in the number of detections following the loosening of some measures such as social distancing and travel restrictions was also observed in Australia [48].

A similar decline in RSV detections coinciding with the period of adoption of restrictions and measures against COVID-19 was observed in Brazil [34,38]. The low detection rates were maintained throughout the winter of 2020 [38]. Likewise, Yeoh et al. [35] observed that as of April 2020, schools were reopened and many of the local restrictions were gradually lifted, and even so, this was not reflected in an increase in RSV cases, contrary to what was observed by Tempia et al. [37] and Foley et al. [48]. The authors highlight that the restrictions imposed on international and interstate travel in Australia in March and April 2020 may have had a major impact on the circulation of non-COVID-19 viruses.

The data reviewed in this work indicates that there was a decline in RSV circulation in the first year of the COVID-19 pandemic, globally. However, after the disappearance of the virus in 2020, RSV cases rose again in 2021, often in periods when a high number of cases were not expected [14,31,45,49]. However, Eldesouki, Uhteg and Mostafa [33] observed, in the USA, that at the end of 2021 and beginning of 2022, with the emergence of the omicron variant, there was another marked drop in detections of RSV, as well as other viruses.

Human Coronavirus, Human Metapneumovirus, and Parainfluenza virus

Human coronaviruses are included in the *Coronaviridae* family and, after human rhinoviruses, are the main cause of the common cold, and in most people, they generally only cause mild infections of the upper respiratory tract. hCoV are enveloped, spherical, single-stranded RNA viruses with positive polarity. There are seven coronaviruses that cause infections in humans, distributed in the genera Alphacoronavirus and Betacoronavirus. hCoV-HKU1, hCoV-NL63, hCoV-229E and hCoV-OC43 are responsible for causing the common cold and the other three, SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2, cause serious respiratory infections in humans and can be fatal [50,51]. hCoV can be transmitted through droplets of respiratory secretions, aerosols and through hand contact with contaminated surfaces [52]. They have a seasonal circulation pattern, with peaks in the winter months [13].

Human metapneumovirus belongs to the *Pneumoviridae* family, as does RSV [25]. It is an enveloped virus, with single-stranded RNA and positive polarity. The virus causes upper and lower respiratory tract infections, mainly affecting children [53]. Transmission of hMPV can occur through respiratory droplets and hand contact with contaminated surfaces [54]. In countries with a temperate

climate, hMPV typically circulates during winter and spring. In the tropics, the period of highest incidence of infections varies greatly [55,56].

Human parainfluenza viruses belong to the *Paramyxoviridae* family [25] and are currently divided into four types: HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3 and HPIV-4. These are enveloped viruses, with single-stranded RNA and negative polarity. HPIVs cause upper and lower respiratory tract infections and frequently cause respiratory infections in infants and children. In most people, the infection resolves on its own, without complications. However, infection with this virus can generate more serious problems such as pneumonia, bronchiolitis and croup [57,58]. After RSV, HPIVs are the main responsible for hospitalizations related to respiratory infections in children under 5 years of age and can also cause serious illnesses in the elderly and immunocompromised people [59,60]. Transmission of HPIVs is similar to that of other respiratory viruses and can occur through droplets of respiratory secretions and hands, objects and surfaces contaminated with the virus [58]. Increased detections of parainfluenza viruses generally occur in spring and early summer, both in the northern and southern hemispheres [56]. However, studies suggest that each type (1,2,3, and 4) has a different seasonality [61,62].

Northern Hemisphere

In the years before the pandemic, during peaks in hCoVs cases, the rate of positive tests could vary from 7.7% to 11.4%. For metapneumovirus, in the months of highest incidence, this rate reached 6.2% to 7.7%. A drop in detections of hCoVs, metapneumovirus and HPIVs was observed in the US during the first year of the pandemic [14,49]. After April 2020, the weekly percentage of positive tests for hCoVs and metapneumovirus reached less than 1%, remaining that way until May 2021. The percentage of positive tests for HPIVs also reached less than 1% throughout 2020, however, a significant increase was observed in 2021, reaching 10.9% in May [14]. Similarly, Francesco et al. [13] also reported a reduction in the percentage of positive tests for hCoVs, metapneumovirus and HPIVs in Italy, in 2020, reaching very low levels, and only increasing again after the first months of 2021.

According to Takashita et al. [30], there was a sudden decline in detections of HPIVs 1-4 and hMPV after February 2020 in Japan. Park, Michelow and Choe [29], in South Korea, reported a significant reduction in monthly detections of the three viruses in 2020 compared to the previous four years. Detections of hCoVs had a monthly reduction ranging from 52.2% to 100% from March 2020, in hospitalized patients. In non-hospitalized patients, there was a drop of 43.7% to 99.3% in monthly detections, following the implementation of social distancing measures. As for metapneumovirus, monthly detections fell between 85.3% and 100% compared to previous years in hospitalized patients and 94.9% to 100% in non-hospitalized patients. Data for HPIVs show a reduction of 88.1% to 100% in monthly detections in hospitalized patients, and 86.2% to 99% for non-hospitalized patients [29].

Chen et al. [15] noted that in adult patients from Taiwan, the positive test rate for hCoVs did not show a statistically significant difference between 2019 and 2020. In the pediatric population, a peak in positive tests was observed in January 2020, followed by a gradual decline in the subsequent months after the implementation of stringent non-pharmaceutical measures. Overall, the positive rate was lower in 2020 than in 2019 (2.2% vs 2.9%, respectively).

Eldesouki, Uhteg and Mostafa [33] also observed that the circulation of PIVs was minimal or zero after the surge of Omicron in the USA. From November 2021 to February 2022, HPIV 2 detections

decreased from 1.59% to zero and HPIV 3 from 1.39% to 0.17%. In this period, no HPIV 1 was observed. In contrast, the authors noted an increase in detections of hCoVs, from 0.66% to 2.43%.

Southern Hemisphere

Few studies in the Southern Hemisphere have evaluated the circulation of these three viruses during the pandemic. In Australia, Abo et al. [17] observed that from 2015 to 2019, the average number of HPIV 1, 2, and 3 detections was 307.6 per year, with peaks occurring in week 38. From week 1 to week 13 of 2020, the detection rate was similar to the mean of previous years (6.4% vs. 5.3%, respectively). However, there was a 66.9% reduction in the proportion of HPIV positives in 2020 compared to the 2015-2019 period. Additionally, there was no detection of the virus from week 28, 2020 onwards.

A study conducted in Brazil from May to November 2020, observed no detection of hCoVs HKU1, 229E, and OC43, and only two out of 420 samples tested positive for hCoV NL63. Additionally, hMPV was detected in only two samples - one from an outpatient and one from a hospitalized patient. HPIVs 1, 2, and 3 were not detected in any sample [10]. Luna et al. [34], also in Brazil, tested 244 hospitalized patients for some respiratory viruses, including hMPV and they saw only one positive sample (0.41%).

Ultimately, there was a drop in the detections of hCoVs, metapneumovirus and HPIVs in 2020, as was observed for RSV and influenza. However, most authors observed an increase in detections and a return in the number of cases to pre-pandemic levels in the first half of 2021. The end of 2020 and beginning of 2021 coincided with the beginning of vaccination against SARS-CoV-2 in the majority of countries and, consequently, with greater relaxation of COVID-19 containment measures, therefore, it is likely that this has favored the increase in the circulation of other viruses.

Human Rhinovirus and Adenovirus

Human rhinoviruses cause the common cold and are responsible for more than half of cases of acute upper respiratory tract infections [63]. HRVs are non-enveloped viruses, with an icosahedral capsid, which contains genetic material formed by single-stranded RNA and positive polarity (+ssRNA). They belong to the *Enterovirus* genus and the *Picornaviridae* family. According to the current classification, based on molecular analyses, three species are recognized: RV A, RV B and RV C [25]. HRV species are genetically very diverse, comprising more than 160 distinct serotypes [64,65]. HRV occurs worldwide and, in the northern hemisphere, circulates throughout the year, with peaks generally occurring in spring and autumn [13]. In Brazil, the virus circulates throughout the year, with an increase in occurrence in the winter months [19]. The prime form of transmission is through direct contact with an infected person, through respiratory droplets, or through contact with contaminated surfaces, where the virus can remain viable for a few hours [66]. Although hand hygiene with soap and water is efficient for removing HRV, disinfectants containing ethanol do not seem to be as efficient [67].

Like HRVs, human adenoviruses are non-enveloped viruses that have some resistance to a few disinfectants [68]. They belong to the *Adenoviridae* family, *Mastadenovirus* genus and are divided into seven species, named A to G [25]. AdVs are icosahedral shaped with double-stranded DNA. There are more than 50 types of adenovirus that cause infections in humans, which can range from mild symptoms, similar to those of a cold, to more serious illnesses, such as pneumonia and bronchitis. Additionally, some types of adenovirus can cause illnesses unrelated to the respiratory tract [68]. Transmission occurs through

respiratory secretions, contact with contaminated objects and surfaces, close contact with infected people and, in some cases, can also occur through feces. Less commonly, adenoviruses can likewise be transmitted through contaminated water [68]. AdV infections occur throughout the year, without a well-defined seasonality, but epidemics seem to occur in winter and early spring [13,69].

Many studies show that rhinoviruses, in contrast with other viruses already discussed, appear to have circulated normally during the pandemic, with the number of detections equal to or greater than pre-pandemic levels, indicating that they were probably not as affected by the measures adopted during the pandemic.

Northern Hemisphere

Contrary to what was observed for all other viruses discussed in this review, both rhinovirus and adenovirus remained circulating in 2020, with rates varying monthly, but showing an increase of up to 135.8% for rhinovirus and 76% for adenovirus in hospitalized patients, in South Korea, according to Park, Michelow and Choe [29]. The authors likewise observed a reduction in both adenovirus and rhinovirus detections in non-hospitalized patients, although they still remained in circulation.

A study in Italy, focusing exclusively on hospitalized adult patients, found a significant increase in rhinovirus detections between March 2020 and May 2021 compared to previous years. In contrast, detections of other viruses showed a significant decline [13]. Moreover, before the pandemic, RSV was the most frequently found virus in co-infections, but during the period analyzed, the only co-infection observed was between SARS-CoV-2 and HRV. Zhang et al. [9], when comparing the rates of positive tests for HRV in the pre-pandemic and pandemic periods, in China, observed that, despite showing a drop in cases in the first half of 2020 in relation to previous years (similar to other viruses), detections rose again in 2020, with a peak in HRV cases in August, in which the rate of positive tests reached 37.25%. This percentage is higher than the average observed for previous years (22.51%), from August 2017 to 2019.

A study by Fine et al. [70] in the USA observed that HRV was consistently detected each month from March 2020 to June 2021, making it the most prevalent virus in the study, with 43.6% of all samples testing positive for rhinovirus. Interestingly, the most frequent co-infection during this period was HRV with AdV. Contrarily, Olsen et al. [14] noted that HRV circulation dropped in March 2020, stayed low until May 2020, and then gradually returned to nearly pre-pandemic seasonal levels in the US. Heiskanen et al. [31] observed a decrease in respiratory infections beginning in March 2020, in Canada, but noted that detections of rhinovirus returned to pre-pandemic levels from August 2020 onwards, when the detections of other respiratory viruses were still low. Chen et al. [15], in Taiwan, compared the detections of some respiratory viruses before the pandemic (Jan-Dec, 2019) to the pandemic period (Jan-May, 2020) and noted that HRV detections in 2020 were similar to those of 2019 and there was no significant difference in the overall positive test rate, for both adults and children, from 2019 to 2020. In the pediatric population, the positive test rate increased to over 30% starting in April 2020 and reached 44.1% in May 2020, a substantial increase compared to the same period in 2019 (23.7%).

According to a study conducted by Nagakubo et al. [12], in Japan, during the period from March to May 2020, out of 292 samples tested for various pathogens, including SARS-CoV-2, 20.2% of the samples were positive, and 79.8% were negative. The most commonly found pathogen during this period was human rhinovirus, in 23 samples, followed by human metapneumovirus and SARS-CoV-2. After June

2020, only 5.8% of 3216 tested samples were positive. During this period, SARS-CoV-2 was already the most frequently detected virus in samples, followed by human rhinovirus and adenovirus, with no detections of respiratory syncytial virus and influenza in any sample. The highest detection rates for human rhinovirus occurred in July, while the highest detection rate for adenovirus occurred in June.

In contrast, Eldesouki, Uhteg and Mostafa [33] saw that from November 2021 to January 2022, during the surge of Omicron variant in the USA, there was a decrease in the positive tests for HRV from 17.73% to 4.57%, followed by an increase in February to 8.85%.

Some studies indicate that adenovirus remained circulating in 2020, albeit with a low prevalence [14,45,46,49,71]. Takashita et al. [30] observed a drop in adenovirus detections in the first year of the pandemic in Japan, although it was still detected. However, Nagakubo et al. [12], also in Japan, observed that adenovirus was one of the most frequent pathogens in the samples analyzed in 2020. Smedberg et al. [32], in the USA, compared adenovirus detections between January to April 2019, 2020 and 2021 and observed no significant change in the rate of positive tests between the three years. This indicates that the circulation of the adenovirus also appears not to have been as affected by the pandemic as the circulation of other respiratory viruses such as influenza and RSV. Later, Eldesouki, Uhteg and Mostafa [33], in the US, observed an increase in positive tests for adenovirus in the context of the surge of the Omicron variant. The positivity increased from 0.93% in November 2021 to 3.3% in February 2022.

Southern Hemisphere

In Australia, during the winter of 2020, the number of monthly rhinovirus detections was significantly higher than the average observed in the previous three years [36]. A study carried out in 2020 in Brazil by the Oswaldo Cruz Foundation [72] evaluated the presence of 21 respiratory viruses in 165 samples negative for SARS-CoV-2, seeking to detect the etiological agent of the infection. In 66.1% of these samples, at least one etiological agent was found and rhinovirus was the most prevalent, being detected in 27.9% of the samples. On the other hand, adenovirus had a low prevalence, being detected in only 4.8% of the samples.

Varela et al. [10], also in Brazil, observed that rhinovirus was the most prevalent pathogen in the pediatric population (<18 years old) between May and November 2020. Of all the patients included in the study, 49.5% (216/436) tested positive for HRV, with SARS-CoV-2 being the second most common pathogen (22.2%). For adenovirus, they observed a low prevalence, with only six positive samples. Eisen et al. [73] also noted that rhinovirus continued to circulate between March and December 2020, with a relatively normal frequency compared to previous years. HRV and adenovirus were the viruses most commonly found in co-infections with SARS-CoV-2, despite the low frequency of adenovirus observed.

Why did rhinovirus continue circulating?

Several studies around the world indicate that the circulation of the rhinovirus was not affected during the pandemic and several papers even report an increase in detections [14,29,36,46]. Research data shows that starting in March 2020, when restrictive measures were taken against COVID-19, detections of rhinovirus also dropped, along with other respiratory viruses. However, detections increased again, in some cases even in the first half of the year, and the rate of positive tests at the end of 2020 and in 2021 often reached levels close to or even higher than those observed before the pandemic [9,14,31,45,74]. Possible

explanations for this phenomenon include the possibility of rhinovirus occupying a niche left vacant by the absence of circulation of other viruses, such as influenza and RSV, and the increased testing of patients with symptoms of respiratory infection [36], however, this last explanation seems unlikely. Another explanation for the initial drop with stricter isolation measures and the subsequent increase in HRV infections is the fact that this is a non-enveloped virus, and therefore more resistant to environmental conditions and remains viable for longer on surfaces.

Transmission of HRV between children occurs easily when there is direct contact between them [75]. Hence, children may have played an important role in reestablishing the circulation of HRV, since the reopening of schools appears to be related to an increase in detections of the virus in several countries. Zhang et al. [9] noted that the increase in rhinovirus detections coincided with the reopening of schools in China. Poole et al. [74] also showed that after the return to school in 2020 there was a sharp increase in rhinovirus detections in adults, suggesting that children acquire the infection and subsequently transmit it to adults. Similarly, Sullivan et al. [36] point out that rhinovirus detections fell during school holidays and school closures. Fine et al. [70] also observed a drop in rhinovirus detections coinciding with school closures. It is likely that professionals from essential sectors, such as healthcare professionals, may also have had some role in maintaining the circulation of HRVs.

Table 1 Table containing papers used in this review that investigated the circulation of respiratory viruses during the COVID-19 pandemic.

Hemisphere	Paper	Country	Study population	Period	Pathogens tested	Main findings
Northern hemisphere	Francesco et al [13]	Italy	Adults (≥ 18 y)	jan 2017 - may 2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses studied, with the exception of AdV (no significant change in circulation) and HRV (significant increase)
	Yuan, Yeung, Yang [46]	USA	Not informed	2015-2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease of 70-90% in circulation for all viruses, except for AdV and HRV. HRV presented a significant increase in circulation during the summer of 2020
	Smedberg et al [32]	USA	All age groups	2019-2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses in 2021 compared to previous years, with the exception of HRV, which presented a significant increase in circulation
	Chen et al [15]	Taiwan	All age groups	jan 2019 - may 2020	IFV; HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Mean decrease of 17% in circulation for all viruses. Only HRV remain circulating, and presented a significant increase in the pediatric population
	Eldesouki, Uhteg, Mostafa [33]	USA	All age groups	nov 2021 - feb 2022	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses, except for adenovirus and hCoV. RSV and IFV activity remain very low throughout the entire period
	Fine et al [70]	USA	All age groups	mar 2016 - jun 2017; mar 2020 - jun 2021	HPIV; RSV; AdV; HRV; hCoV	Decrease in the circulation of all viruses studied, with the exception of HRV, that continued to circulate. hCoVs also were common and continued to circulate
	Haddadin et al [49]	USA	Children and adults	apr 2018 - jul 2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Acute decrease in the absolute frequencies of all viruses. However, HRV and AdV continued to circulate, despite a initial drop after the implementation of measures against Covid-19
	Heiskanen et al [31]	Canada	Children and adults	2018-2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for most viruses. HRV, AdV, hMPV circulation was unchanged. RSV and HPIV returned to pre-pandemic circulation levels in September and June 2021, respectively. The same was not observed for Flu
	Hu et al [45]	USA	All age groups	2016-2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses except HRV, which showed an increase in circulation. Circulation of all non-influenza viruses increased again from March 2021
	Kim et al [71]	South Korea	All age groups (0 y - >65 y)	2016-2020	IFV (A/H1N1pdm09, A/H3N2, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for enveloped viruses (Flu, HPIV, RSV hCoV, hMPV). Non-enveloped viruses remain circulating (HRV, AdV). HRV circulation increased significantly in 2020
	Nagakubo et al [12]	Japan	All age groups (0-103 y)	mar 2020 - feb 2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses except HRV and AdV
	Olsen et al [14]	USA	Not informed	2016-2021	IFV (A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses. HRV and AdV activity decreased in spring 2020, but later resume to normal levels

15
16
17

18	Southern hemisphere	Park, Michelow, Choe [29]	South Korea	Not informed	2016-2020	IFV; HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in circulation for all viruses, except AdV, HRV, and hBoV. The frequency of HRV increased in hospitalized patients
19		Takashita et al [30]	Japan	All age groups	jan 2018 - sep 2020	IFV; HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease in IFV and other respiratory viruses circulation. HRV was the only one which presented a significant increase. After May 2020, enveloped viruses were not detected (Flu, hMPV, HPIV, RSV), but non-enveloped viruses were (HRV, AdV)
20		Torres-Fernandez et al [18]	Spain	Children	jan 2016 - dec 2020	RSV	65% decrease in RSV cases in 2020. After May RSV disappears completely, only returning at the end of the year.
21		Ye, Wang [28]	China	Children (<18 y)	jan 2019 - dec 2020	IFV (A, B); RSV; AdV	Decrease in the circulation of all viruses. The typical seasonality of IFV and AdV was not observed in 2020
22		Zhang et al [9]	China	Children (<14 y)	jan 2017 - dec 2020	IFV; HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Decrease of c. 86-92% in circulation for Flu, RSV, AdV and HRV. After June 2020 a significative increase in HRV circulation was observed
23	Southern hemisphere	Abo et al [17]	Australia	Children (<18 y)	2015-2020	IFV (A, B); HPIV; RSV	Decrease of 67%-89% in the circulation of all viruses studied
24		Varela et al [38]	Brazil	Children (>2 m), adults (≥18 y)	may 2020 - aug 2020	IFV (A, B); RSV	Did not compare pre-pandemic and pandemic periods. Of the 1428 samples tested during the period, none were positive for the viruses tested.
25		Eisen et al [73]	Brazil	All age groups	mar 2020 - dec 2020	IFV (A, B); HRV	Did not compare pre-pandemic and pandemic periods. Number of IFV cases was below the expected. HRV cases follow the expected pattern
26		Friedrich et al [47]	Brazil	Children (<1 y)	2016 - 2020	Cases of acute bronchiolitis (w/o RSV diagnosis)	2020 presented an acute decrease in bronchiolitis cases (which are often caused by RSV) in children
27		Matos et al [72]	Brazil	Adults and elders (27-81 y)	feb 2020 - Mar 2020	IFV (A/H1N1pdm09, A, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Did not compare pre-pandemic and pandemic periods. High frequency of HRV and low frequency of IFV and other pathogens were observed
28		Sullivan et al [36]	Australia	Not informed	2015-2020	IFV; RSV; HRV	Decrease in IFV and RSV circulation. HRV circulation was above the mean value observed in 2015-2019
29		Tempia et al [37]	South Africa	All age groups	jan 2013 - oct 2020	IFV; RSV	Decrease in IFV and RSV circulation. There was an increase in RSV infections after July, but the same was not observed for IFV
30		Varela et al [10]	Brazil	Children (2 m -18 y)	may 2020 - nov 2020	IFV (A H1, A H3, B); HPIV; RSV; AdV; hMPV; HRV; hCoV	Did not compare pre-pandemic and pandemic periods. 49.5% of all patients were positive for HRV. The number of cases of RSV and IFV were way below the expected
31		Yeoh et al [35]	Australia	Children (<16 y)	jan 2012 - aug 2020	IFV; RSV	98% and 99% decrease in RSV and IFV cases, respectively
32		Foley et al [48]	Australia	Children (<16 y)	jan 2012 - dec 2020	RSV	Initial decrease in cases after the implementation of COVID-19 restrictions, followed by an acute increase after late September, exceeding the mean cases number for 2012-2019
33	Southern hemisphere	Luna et al [34]	Brazil	Children (RSV); all age groups (other viruses)	2016-2020	IFV (A, B); RSV; hMPV	Decrease in circulation for all viruses studied

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Non-pharmacological measures

SARS-CoV-2 can be transmitted through respiratory droplets and aerosols, which can be inhaled or deposited in a person's nose, mouth and eyes. Transmission can also occur by touching contaminated surfaces or objects, but this is not the main transmission route, so the risk of contracting COVID-19 this way is relatively low [76]. This mode of transmission of SARS-CoV-2 is similar to that of several other respiratory viruses. Therefore, measures aimed at preventing or reducing the transmission of SARS-CoV-2 may also affect the transmission of other viruses [77].

With the onset of the COVID-19 pandemic and its subsequent global spread, non-pharmacological measures were implemented in most countries in an attempt to curb the spread of the virus and avoid the health systems overload. As it was a new disease, there were yet no vaccines or specific treatment against COVID-19, which made the adoption of these measures necessary [78]. The actions adopted and their degree of rigor varied according to the location and severity of the situation over time, and included confinements, national and international travel restrictions, encouraging hand hygiene, compulsory use of masks, cancellation of events and closures of schools [79].

As demonstrated previously, several studies described a change in the seasonality of common respiratory viruses during the COVID-19 pandemic and attribute this change to the non-pharmacological measures adopted, as the drop in the number of detections of several viruses appears to have coincided with the adoption of the aforementioned measures [13,17,35,47]. Similarly, during the SARS-CoV epidemic in 2003 in Taiwan, a drop in respiratory infections was also observed after the adoption of non-pharmacological measures [15]. In addition to non-pharmacological measures, changes in the circulation of other respiratory viruses may also involve behavioral changes in the population regarding seeking medical care, the intrinsic characteristics of each respiratory virus, and changes in testing priority [36, 78].

The circulation of RSV appears to have been greatly affected by school closures and social distancing, as this has reduced social interactions in general, and also reduced close contact between children, which represents an important way of transmitting the virus [78]. In some studies, a return of RSV cases was observed after the reopening of schools and relaxation of measures [37,48], in others, this increase was not observed, and even after the reopening of schools and the return of other activities, circulation did not return to pre-pandemic levels [18,35]. Torres-Fernandez et al. [18] points out that after reopening, schools adopted individual measures to contain the transmission of SARS-CoV-2, which may have continued to prevent the increase in RSV cases. Despite this, children had opportunities to become infected in other environments, which does not fully explain the absence of cases.

The closure of international borders and restrictions on interstate travel established in some countries may have had an impact on the circulation of other respiratory viruses, as this leads to an elimination of local reservoirs capable of sustaining viral circulation, which may explain the absence of cases even with the subsequent loosening of restrictions. The improvement in personal hygiene and the encouragement of physical distancing, even with schools and establishments open once again, may also have contributed to the reduction in cases [35].

Tempia et al. [37] discusses that a possible explanation for the decrease in the number of influenza and RSV cases would be that the restrictions imposed on international travel contributed to the drop in cases of both, but it may have had a greater effect on influenza viruses, since the later have a very marked

seasonality in South Africa, while RSV circulates all year round, enabling the existence of local reservoirs. Furthermore, it is argued that as influenza has a lower effective reproduction number than RSV, COVID-19 control measures may have had a greater impact on its circulation.

Kaiser et al. [80] demonstrate that non-pharmacological measures had an important effect on the reduction in RSV and influenza infections, in addition to SARS-CoV-2. The closure of workplaces seems to have had a significant effect on reducing the number of influenza cases and the closure of schools may also have been beneficial, but the authors found no evidence pointing to effectiveness of measures such as travel restrictions [80]. However, it appears to be difficult to determine the impact that each non-pharmacological intervention had, individually, on the circulation of other viruses, owing to the fact that there is no standardized nomenclature to refer to non-pharmacological measures and there is often inconsistent information about when a measure was adopted.

As some authors pointed out, many of the restrictions adopted to contain the spread of SARS-CoV-2 were necessary and extremely efficient, however, many are impossible to maintain to control cases of common respiratory viruses, both due to the economic and social impacts. There is a need to understand exactly which of these measures had a greater impact on the circulation of these viruses and which could be implemented in the future during epidemic periods [17,75,81].

Viral interference

Viral interference occurs when infection of the respiratory tract by one virus interferes with the infection and replication capacity of another. This possibly occurs due to the innate, non-specific immune response, induced by infection with the first virus, which makes subsequent infection by another virus difficult [82]. This phenomenon has already been observed between influenza A and RSV [83] and between influenza A and HRV [84]. A study carried out in France proposed that during the influenza A/H1N1 pandemic in 2009, HRV caused a delay in the circulation of the virus as a result of viral interference [85]. However, another study, from China, did not corroborate these results [86].

Some authors speculate that viral interference may have played a role in the drop in detections of other viruses during the COVID-19 pandemic. Di Mattia et al. [87] suggests that viral interference between SARS-CoV-2 and RSV may have contributed to the change in the seasonal pattern of this virus. Studies also show that HRV, in cell culture, impairs the replication of SARS-CoV-2, due to the rapid interferon response generated by the virus, which makes cells non-permissive to infection by SARS-CoV-2. The opposite does not appear to occur, and SARS-CoV-2 infection does not have a detrimental effect on HRV replication [84,88]

Enveloped and non-enveloped viruses

Viruses can be classified according to the presence or absence of the viral envelope, a lipid layer surrounding the viral capsid. Both influenza and SARS-CoV-2 are enveloped viruses, while HRV and adenoviruses are non-enveloped viruses [15]. Non-enveloped viruses, in general, are more stable in the environment and more resistant to heat and desiccation compared to enveloped viruses, and, therefore, can remain viable on surfaces for a longer period [89,90].

Park, Michelow and Choe [29] reported a significant reduction in detections of enveloped viruses, such as influenza, RSV, human coronavirus, human metapneumovirus, and parainfluenza, since social

distancing was implemented. All of these viruses had monthly detection rate reductions of 100% in hospitalized patients and nearly 100% in non-hospitalized patients. On the other hand, infections by non-enveloped viruses such as HRV and adenovirus persisted, and the rates of positive tests for HRV in hospitalized patients increased, contrary to what was observed for other respiratory viruses. According to the author, this highlights the need for better public health interventions, regarding non-enveloped viruses.

Possible explanations for this phenomenon are related to the mode of transmission and the structural characteristics of the non-enveloped viruses. Measures such as encouraging hand washing and increasing the use of disinfectants such as ethanol have a major impact on the transmission of enveloped viruses, such as influenza and RSV, by damaging the viral envelope, making the virus unable to infect [75,87]. Furthermore, enveloped viruses, in general, remain viable for less time on surfaces compared to non-enveloped viruses and the use of masks, by stopping saliva droplets, may also hinder the transmission of these viruses [75,87]. The use of surgical masks, widely adopted during the pandemic, seems to be efficient in preventing the transmission of influenza viruses and human coronaviruses from symptomatic individuals, but does not appear to have the same impact on the transmission of HRV [39], which may have contributed to its persistence.

Non-enveloped viruses, such as HRV, are more resistant to inactivation by disinfectants such as ethanol, and more stable in the environment, making them remain viable on surfaces for longer [29,67,90]. As contact with contaminated surfaces represents an important form of HRV transmission [66], it may have been able to remain circulating even with measures to contain the spread of SARS-CoV-2, transmitted mainly through droplets, saliva and aerosols, with a low risk of transmission via surfaces [1,76].

Champredon et al. [7] and Kitanovski et al. [91] suggest that because HRV persisted during the pandemic, it could act as an indicator of adherence to health measures or the need to implement them, not only in relation to COVID-19, but also in possible future epidemics. Champredon et al. [7] point out that positivity rates for SARS-CoV-2 were often preceded by an increase in positivity for HRV, suggesting that these viruses could warn of a potential resurgence and an increase in cases of COVID-19.

Influenza A/H1N1 2009 pandemic

During the influenza A/H1N1 pandemic which began in 2009, it does not appear that the same phenomenon observed in the COVID-19 pandemic occurred, and other respiratory viruses, besides influenza, seem to have circulated normally [92-97]. Only a few authors observed a delay in the expected increase in the number of RSV cases between 2009 and 2010, compared to previous years [98,99]. On the other hand, Navarro-Mari et al. [95] demonstrated that the seasonal increase in RSV cases occurred normally between 2009 and 2010. Hombrouck et al. [93] also did not observe any impact of H1N1 on the circulation of RSV.

In contrast to the COVID-19 pandemic, several respiratory viruses continued to circulate during the H1N1 pandemic. The variety of respiratory viruses circulating during the 2009 pandemic was not reduced, and there was co-circulation with influenza. One possible explanation for this difference is that the measures adopted during the 2009 pandemic were not as stringent as those implemented in early 2020.

Conclusions

During the COVID-19 pandemic, the circulation of various common respiratory viruses was affected. Detections of influenza, RSV, hCoVs, HPIVs, and hMPV dropped significantly, but adenovirus and, especially, HRV seem not to have been as affected. Factors contributing to this scenario include the adoption of non-pharmacological measures to curb COVID-19, behavioral changes in the population regarding hygiene habits, intrinsic characteristics of each virus such as transmission mode and the presence or absence of a viral envelope. Rhinovirus is particularly intriguing for having maintained a high prevalence during the early years of the pandemic, and it may be worthwhile to further investigate different possible explanations for this phenomenon.

Declarations

Funding: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Competing interests: The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

References

- 1 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024) About COVID-19. CDC.
2 <https://www.cdc.gov/covid/about/>. Accessed 21 October 2024
- 3
- 4 World Health Organization (WHO) (2024) COVID-19 deaths. WHO Health Emergencies Programme.
5 <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>. Accessed 12 September 2024
- 6
- 7 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2024) Coronaviridae. ICTV Report
8 Chapters. <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae>. Accessed 16 January 2024
- 9
- 10 Singhal, Tanu (2020) A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr.* 87(4):81-
11 286. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>
- 12
- 13 Zhu N, Zhang D, Wang W et al (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China,
14 2019. *N Engl J Med* 382:727-733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- 15
- 16 Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M et al (2020) A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals
17 targets for drug repurposing. *Nature* 583:459-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- 18
- 19 Champredon D, Bancej C, Lee L, Buckrell S (2021) Implications of the unexpected persistence of
20 human rhinovirus/enterovirus during the COVID-19 pandemic in Canada. *Influenza and Other Respir*
21 *Viruses* 16(2):190-192. <https://doi.org/10.1111/irv.12930>
- 22
- 23 Kiseleva I, Ksenafontov A (2021) COVID-19 Shuts Doors to Flu but Keeps Them Open to
24 Rhinoviruses. *Biology (Basel)* 10(8):733. <https://doi.org/10.3390/biology10080733>
- 25
- 26 Zhang RX, Chen DM, Qian Y, Sun Y, Zhu RN, Wang F, Ding YX, Guo Q, Zhou YT, Qu D, Cao L,
27 Zhu CM, Zhao LQ (2021) Surges of hospital-based rhinovirus infection during the 2020 coronavirus
28 disease-19 (COVID-19) pandemic in Beijing, China. *World J Pediatr* 17(6):590-596.
29 <https://doi.org/10.1007/s12519-021-00477-2>
- 30
- 31 Varela FH, Sartor ITS, Polese-Bonatto M, Azevedo TR, Kern LB, Fazolo T, de David CN, Zavaglia
32 GO, Fernandes IR, Krauser JRM, Stein RT, Scotta MC (2022). Rhinovirus as the main co-circulating
33 virus during the COVID-19 pandemic in children. *J. Pediatr.* 98(6):579–586.
34 <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2022.03.003>
- 35
- 36 Kesson AM (2007) Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* 8(3):240-8.
37 <https://doi.org/10.1016/j.prv.2007.07.003>
- 38
- 39 Nagakubo Y, Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Hosaka K, Amemiya K, Sueki H, Hayakawa M,
40 Mochizuki H, Tsutsui T, Kakizaki Y, Miyashita Y, Omata M (2022) Non-pharmaceutical interventions
41 during the COVID-19 epidemic changed detection rates of other circulating respiratory pathogens in
42 Japan. *PLoS One* 17(1):e0262874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262874>
- 43
- 44 De Francesco MA, Pollara C, Gargiulo F, Giacomelli M, Caruso A (2021) Circulation of Respiratory
45 Viruses in Hospitalized Adults before and during the COVID-19 Pandemic in Brescia, Italy: A
46 Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health* 18(18):9525. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189525>
- 47
- 48 Olsen SJ, Winn AK, Budd AP et al (2021) Changes in Influenza and Other Respiratory Virus Activity
49 During the COVID-19 Pandemic - United States, 2020-2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*
50 70(29):1013-1019. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7029a1>
- 51
- 52 Chen AP, Chu IY, Yeh ML, Chen YY, Lee CL, Lin HH, Chan YJ, Chen HP (2021) Differentiating
53 impacts of non-pharmaceutical interventions on non-coronavirus disease-2019 respiratory viral infections:
54 Hospital-based retrospective observational study in Taiwan. *Influenza Other Respir Viruses* 15(4):478-
55 487. <https://doi.org/10.1111/irv.12858>
- 56
- 57 Obando-Pacheco P, Justicia-Grande AJ, Rivero-Calle I et al (2018) Respiratory Syncytial Virus
58 Seasonality: A Global Overview. *J Infect Dis* 217(9):1356-1364. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy056>
- 59
- 60 Abo YN, Clifford V, Lee LY, Costa AM, Crawford N, Wurzel D, Daley AJ (2021) COVID-19 public
61 health measures and respiratory viruses in children in Melbourne. *J Paediatr Child Health* 57(12):1886-
62 1892. <https://doi.org/10.1111/jpc.15601>
- 63
- 64 Torres-Fernandez D, Casellas A, Mellado MJ, Calvo C, Bassat Q (2021) Acute bronchiolitis and
65 respiratory syncytial virus seasonal transmission during the COVID-19 pandemic in Spain: A national

- perspective from the pediatric Spanish Society (AEP). *J Clin Virol* 145:105027. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105027>
- 19** WATANABE, ASA (2011) Caracterização genética de rinovírus humano em amostras de populações distintas do Estado de São Paulo. Dissertation, Universidade Federal de São Paulo
- 20** Wang Y, Chen Z, Yan YD, Guo H, Chu C, Liu J, Ding Y, Shao X, Xu J, Ji W (2013) Seasonal distribution and epidemiological characteristics of human metapneumovirus infections in pediatric inpatients in Southeast China. *Arch Virol* 158(2):417-24. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1492-7>
- 21** He Y, Lin GY, Wang Q, Cai XY, Zhang YH, Lin CX, Lu CD, Lu XD (2014) A 3-year prospective study of the epidemiology of acute respiratory viral infections in hospitalized children in Shenzhen, China. *Influenza Other Respir Viruses* 8(4):443-451. <https://doi.org/10.1111/irv.12257>
- 22** Álvarez-Argüelles ME, Rojo-Alba S, Martínez ZP, Negro AL, Riveiro JAB, Álvarez MAA, Suárez JR, Navarro MO, García SM (2018) New clinical and seasonal evidence of infections by Human Parainfluenzavirus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37:2211-2217. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3363-y>
- 23** Principi N, Autore G, Ramundo G, Esposito S (2023) Epidemiology of Respiratory Infections during the COVID-19 Pandemic. *Viruses* 15(5):1160. <https://doi.org/10.3390/v15051160>
- 24** Pan-American Health Organization (PAHO) (2019) OMS lança nova estratégia mundial para controle da influenza. PAHO. <https://www.paho.org/pt/noticias/11-3-2019-oms-lanca-nova-estrategia-mundial-para-controle-da-influenza>. Accessed 05 July 2023
- 25** International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2024). <https://ictv.global/taxonomy>. Accessed 16 January 2024
- 26** Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024) About Flu. CDC. <https://www.cdc.gov/flu/about/>. Accessed 21 October 2024
- 27** Hutchinson EC (2018) Influenza Virus. *Trends in Microbiology* 26(9):809-810. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>
- 28** Ye Q, Wang D (2022) Epidemiological changes of common respiratory viruses in children during the COVID-19 pandemic. *J Med Virol* 94(5):1990-1997. <https://doi.org/10.1002/jmv.27570>
- 29** Park S, Michelow IC, Choe YJ (2021) Shifting Patterns of Respiratory Virus Activity Following Social Distancing Measures for Coronavirus Disease 2019 in South Korea. *J Infect Dis* 224(11):1900-1906. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab231>
- 30** Takashita E, Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Shimizu K, Ozawa H, Kumazaki M, Usuku S, Tanaka N, Okubo I, Morita H, Nagata S, Watanabe S, Hasegawa H, Kawaoka Y (2021) Increased risk of rhinovirus infection in children during the coronavirus disease-19 pandemic. *Influenza Other Respir Viruses* 15(4):488-494. <https://doi.org/10.1111/irv.12854>
- 31** Heiskanen A, Galipeau Y, Little J, Mortimer L, Ramotar K, Langlois MA, Cooper CL (2023) Seasonal respiratory virus circulation was diminished during the COVID-19 pandemic. *Influenza Other Respir Viruses* 17(1):e13065. <https://doi.org/10.1111/irv.13065>
- 32** Smedberg JR, DiBiase LM, Hawken SE, Allen A, Mohan S, Santos C, Smedberg T, Barzin AH, Wohl DA, Miller MB (2022) Reduction and persistence of co-circulating respiratory viruses during the SARS-CoV-2 pandemic. *Am J Infect Control* 50(9):1064-1066. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.06.008>
- 33** Eldesouki RE, Uhteg K, Mostafa HH (2022) The circulation of Non-SARS-CoV-2 respiratory viruses and coinfections with SARS-CoV-2 during the surge of the Omicron variant. *J Clin Virol* 153:105215. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105215>
- 34** Luna LKS, Perosa DAH, Conte DD, Carvalho JMA, Alves VRG, Cruz JS, Bellei N (2020) Different patterns of Influenza A and B detected during early stages of COVID-19 in a university hospital in São Paulo, Brazil. *J Infect* 81(2):e104-e105. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.036>
- 35** Yeoh DK, Foley DA, Minney-Smith CA, Martin AC, Mace AO, Sikazwe CT, Le H, Levy A, Blyth CC, Moore HC (2021) Impact of Coronavirus Disease 2019 Public Health Measures on Detections of Influenza and Respiratory Syncytial Virus in Children During the 2020 Australian Winter. *Clin Infect Dis* 72(12):2199-2202. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1475>

- 36 Sullivan SG, Carlson S, Cheng AC, Chilver MB, Dwyer DE, Irwin M, Kok J, Macartney K, MacLachlan J, Minney-Smith C, Smith D, Stocks N, Taylor J, Barr IG (2020) Where has all the influenza gone? The impact of COVID-19 on the circulation of influenza and other respiratory viruses, Australia, March to September 2020. *Euro Surveill* 25(47):2001847. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.47.2001847>
- 37 Tempia S, Walaza S, Bhiman JN et al (2021) Decline of influenza and respiratory syncytial virus detection in facility-based surveillance during the COVID-19 pandemic, South Africa, January to October 2020. *Euro Surveill* 26(29):2001600. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2001600>
- 38 Varela FH, Scotta MC, Polese-Bonatto M et al (2021) Absence of detection of RSV and influenza during the COVID-19 pandemic in a Brazilian cohort: Likely role of lower transmission in the community. *J Glob Health* 11:05007. <https://doi.org/10.7189/jogh.11.05007>
- 39 Leung NHL, Chu DKW, Shiu EYC, Chan KH, McDevitt JJ, Hau BJP, Yen HL, Li Y, Ip DKM, Peiris JSM, Seto WH, Leung GM, Milton DK, Cowling BJ (2020) Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. *Nat Med* 26(5):676-680. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0843-2>
- 40 Caini S, Meijer A, Nunes MC, Henaff L, Zounon M, Boudewijns B, Del Riccio M, Paget J (2024) Probable extinction of influenza B/Yamagata and its public health implications: a systematic literature review and assessment of global surveillance databases. *Lancet Microbe* 5(8):100851. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(24\)00066-1](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(24)00066-1)
- 41 Jha A, Jarvis H, Fraser C, Openshaw PJM (2016) Respiratory Syncytial Virus. In: Hui DS, Rossi GA, Johnston SL (ed) SARS, MERS and other Viral Lung Infections. European Respiratory Society, Sheffield (UK)
- 42 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2023) Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV). CDC. <https://www.cdc.gov/rsv/index.html>. Accessed 16 January 2024
- 43 Langedijk AC, Bont LJ (2023) Respiratory syncytial virus infection and novel interventions. *Nat Rev Microbiol* 21:734–749. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00919-w>
- 44 Meissner HC (2016) Viral Bronchiolitis in Children. *N Engl J Med* 374(1):62-72. <https://doi.org/10.1056/nejmra1413456>
- 45 Hu W, Fries AC, DeMarcus LS, Thervil JW, Kwaah B, Brown KN, Sjoberg PA, Robbins AS (2022) Circulating Trends of Influenza and Other Seasonal Respiratory Viruses among the US Department of Defense Personnel in the United States: Impact of the COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health* 19(10):5942. <https://doi.org/10.3390/ijerph19105942>
- 46 Yuan H, Yeung A, Yang W (2022) Interactions among common non-SARS-CoV-2 respiratory viruses and influence of the COVID-19 pandemic on their circulation in New York City. *Influenza Other Respir Viruses* 16(4):653-661. <https://doi.org/10.1111/irv.12976>
- 47 Friedrich F, Ongaratto R, Scotta MC, Veras TN, Stein RT, Lumertz MS, Jones MH, Comaru T, Pinto LA (2021) Early Impact of Social Distancing in Response to Coronavirus Disease 2019 on Hospitalizations for Acute Bronchiolitis in Infants in Brazil. *Clin Infect Dis* 72(12):2071-2075. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1458>
- 48 Foley DA, Yeoh DK, Minney-Smith CA, Martin AC, Mace AO, Sikazwe CT, Le H, Levy A, Moore HC, Blyth CC (2021) The Interseasonal Resurgence of Respiratory Syncytial Virus in Australian Children Following the Reduction of Coronavirus Disease 2019-Related Public Health Measures. *Clin Infect Dis* 73(9):e2829-e2830. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1906>
- 49 Haddadin Z, Spieker AJ, Rahman H, Rankin DA, Talj R, Yanis A, Amarín JZ, Schmitz J, Chappell J, Halasa NB (2022) Respiratory pathogens during the COVID-19 pandemic: Alterations in detection and seasonality in Nashville, Tennessee. *PLoS One* 17(8):e0270469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270469>
- 50 Pan-American Health Organization (PAHO) (2020) Histórico da pandemia de COVID-19. PAHO. <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Accessed 16 January 2024
- 51 Shah MM, Winn A, Dahl RM, Kniss KL, Silk BJ, Killerby ME (2022) Seasonality of Common Human Coronaviruses, United States, 2014–2021. *Emerg Infect Dis*. 28(10):1970-1976. <https://doi.org/10.3201/eid2810.220396>

- 52 Tomazella KC (2013) Infecção por coronavírus humanos em populações distintas: aspectos clínicos e epidemiológicos. Dissertation, Universidade Federal de São Paulo
- 53 Uddin S, Thomas M (2023) Human Metapneumovirus. Statpearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560910/>. Accessed 16 January 2024
- 54 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024) About Human Metapneumovirus. CDC.
<https://www.cdc.gov/human-metapneumovirus/about/index.html>. Accessed 18 October 2024
- 55 Kahn JS (2006) Epidemiology of Human Metapneumovirus. Clin Microbiol Rev.
<https://doi.org/10.1128/cmr.00014-06>
- 56 Li Y, Reeves RM, Wang X, Bassat Q, Brooks WA, Cohen C, Moore DP, Nunes M, Rath B, Campbell H, Nair H, RSV Global Epidemiology Network, RESCEU investigators (2019) Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. Lancet Glob Health 7(8):e1031-e1045.
[https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(19\)30264-5](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(19)30264-5)
- 57 Elboukari H, Ashraf M (2023) Parainfluenza Virus. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560719/>. Accessed 17 January 2024
- 58 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024) About Human Parainfluenza Viruses (HPIVs). CDC. <https://www.cdc.gov/parainfluenza/index.html>. Accessed 18 October 2024
- 59 DeGroot NP, Haynes AK, Taylor C, Killerby ME, Dahl RM, Mustaquim D, Gerber SI, Watson JT (2020) Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011-2019. J Clin Virol 124:104261.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104261>
- 60 Branche AR, Falsey AR (2016) Parainfluenza Virus Infection. Semin Respir Crit Care Med 37(4):538-54. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>
- 61 Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ (2006) Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. Clin Infect Dis 43(8):1016-1022.
<https://doi.org/10.1086/507638>
- 62 Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T (2012) Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. Microbiol Immunol 56(12):855-858.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00507.x>
- 63 Vandini S, Biagi C, Fischer M, Lanari M (2019) Impact of Rhinovirus Infections in Children. Viruses 11(6):521. <https://doi.org/10.3390/v11060521>
- 64 Simmonds P, McIntyre C, Savolainen-Kopra C, Tapparel C, Mackay IM, Hovi T (2010) Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types. J Gen Virol 91:2409-2419. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023994-0>
- 65 McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P (2013) Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. J Gen Virol 94:1791-1806.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.053686-0>
- 66 Royston L, Tapparel C (2016) Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. Viruses 8(1):16. <https://doi.org/10.3390/v8010016>
- 67 Savolainen-Kopra C, Korpela T, Simonen-Tikka ML, Amiryousefi A, Ziegler T, Roivainen M, Hovi T (2012) Single treatment with ethanol hand rub is ineffective against human rhinovirus--hand washing with soap and water removes the virus efficiently. J Med Virol 84(3):543-547.
<https://doi.org/10.1002/jmv.23222>
- 68 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024) About Adenovirus. CDC.
<https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html>. Accessed 17 January 2024
- 69 Mitchell LS, Taylor B, Reimels W, Barrett FF, Devincenzo JP (2000) Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. Pediatr Infect Dis J 19(10): 996-1000.
<https://doi.org/10.1097/00006454-200010000-00011>
- 70 Fine SR, Bazzi LA, Callear AP, Petrie JG, Malosh RE, Foster-Tucker JE, Smith M, Ibiebele J, McDermott A, Rolfes MA, Monto AS, Martin ET (2023) Respiratory virus circulation during the first

- year of the COVID-19 pandemic in the Household Influenza Vaccine Evaluation (HIVE) cohort. *Influenza Other Respir Viruses* 17(3):e13106. <https://doi.org/10.1111/irv.13106>
- 71 Kim HM, Lee EJ, Lee NJ, Woo SH, Kim JM, Rhee JE, Kim EJ (2021) Impact of coronavirus disease 2019 on respiratory surveillance and explanation of high detection rate of human rhinovirus during the pandemic in the Republic of Korea. *Influenza Other Respir Viruses* 15(6):721-731. <https://doi.org/10.1111/irv.12894>
- 72 Matos AR, Motta FC, Caetano BC, Ogrzewalska M, Garcia CC, Lopes JCO, Miranda M, Livorati MTFP, Abreu A, David Brown D, Siqueira MM (2020) Identification of SARS-CoV-2 and additional respiratory pathogens cases under the investigation of COVID-19 initial phase in a Brazilian reference laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115:e200232. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200232>
- 73 Eisen AKA, Gularte JS, Demoliner M, de Abreu Goés Pereira VM, Heldt FH, Filippi M, de Almeida PR, Hansen AW, Fleck JD, Spilki FR (2021) Low circulation of Influenza A and coinfection with SARS-CoV-2 among other respiratory viruses during the COVID-19 pandemic in a region of southern Brazil. *J Med Virol* 93(7):4392-4398. <https://doi.org/10.1002/jmv.26975>
- 74 Poole S, Brendish NJ, Tanner AR, Clark TW (2020) Physical distancing in schools for SARS-CoV-2 and the resurgence of rhinovirus. *Lancet Respir Med* 8(12):e92-e93. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30502-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30502-6)
- 75 Britton PN, Hu N, Saravanos G, Shrapnel J, Davis J, Snelling T, Dalby-Payne J, Kesson AM, Wood N, Macartney K, McCullagh C, Lingam R (2020) COVID-19 public health measures and respiratory syncytial virus. *Lancet Child Adolesc Health* 4(11):e42-e43. [https://doi.org/10.1016/s2352-4642\(20\)30307-2](https://doi.org/10.1016/s2352-4642(20)30307-2)
- 76 National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD) (2021) Science Brief: SARS-CoV-2 and Surface (Fomite) Transmission for Indoor Community Environments. COVID-19 Science Briefs [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570437/>. Accessed 19 January 2024
- 77 Garg I, Shekhar R, Sheikh AB, Pal S (2022) Impact of COVID-19 on the Changing Patterns of Respiratory Syncytial Virus Infections. *Infect Dis Rep* 14(4):558-568. <https://doi.org/10.3390/idr14040059>
- 78 Chow EJ, Uyeki TM, Chu HY (2023) The effects of the COVID-19 pandemic on community respiratory virus activity. *Nat Rev Microbiol* 21(3):195-210. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00807-9>
- 79 Shen Y, Powell G, Ganser I, Zheng Q, Grundy C, Okhmatovskaia A, Buckeridge DL (2021) Monitoring non-pharmaceutical public health interventions during the COVID-19 pandemic. *Sci Data*. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01001-x>
- 80 KAISER M, Otterbach S, Sousa-Poza A, Bloom DE (2020). Interventions with Positive Side-Effects: COVID-19 non-pharmaceutical interventions and infectious diseases in europe. IZA Discussion Paper Series. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3747444>
- 81 Partridge E, McCleery E, Cheema R, Nakra N, Lakshminrusimha S, Tancredi DJ, Blumberg DA (2021) Evaluation of Seasonal Respiratory Virus Activity Before and After the Statewide COVID-19 Shelter-in-Place Order in Northern California. *JAMA Netw Open* 4(1):e2035281. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35281>
- 82 Piret J, Boivin G (2022) Viral Interference between Respiratory Viruses. *Emerg Infect Dis* 28(2):273-281. <https://doi.org/10.3201/eid2802.211727>
- 83 Chan KF, Carolan LA, Korenkov D, Druce J, McCaw J, Reading PC, Barr IG, Laurie KL (2018) Investigating Viral Interference Between Influenza A Virus and Human Respiratory Syncytial Virus in a Ferret Model of Infection. *J Infect Dis* 218(3):406-417. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy184>
- 84 Dee K, Goldfarb DM, Haney J, Amat JAR, Herder V, Stewart M, Szemiel AM, Baguelin M, Murcia PR (2021) Human Rhinovirus Infection Blocks Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication Within the Respiratory Epithelium: Implications for COVID-19 Epidemiology. *J Infect Dis* 224(1):31-38. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab147>
- 85 Casalegno JS, Ottmann M, Duchamp MB, Escuret V, Billaud G, Frobert E, Morfin F, Lina B (2010) Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin Microbiol Infect* 16(4):326-329. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03167.x>

- 86 Sun Y, Zhu R, Zhao L, Deng J, Wang F, Ding Y, Yuan Y, Qu D, Qian Y (2014) Effect of human rhinovirus infection in pediatric patients with influenza-like illness on the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus. *Chin Med J (Engl)* 127(9):1656-1660
- 87 Di Mattia G, Nenna R, Mancino E, Rizzo V, Pierangeli A, Villani A, Midulla F (2021) During the COVID-19 pandemic where has respiratory syncytial virus gone? *Pediatr Pulmonol* 56(10):3106-3109. <https://doi.org/10.1002/ppul.25582>
- 88 Cheemarla NR, Watkins TA, Mihaylova VT, Wang B, Zhao D, Wang G, Landry ML, Foxman EF (2021) Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics. *J Exp Med* 218(8):e20210583. <https://doi.org/10.1084/jem.20210583>
- 89 Firquet S, Beaujard S, Lobert PE, Sané F, Caloone D, Izard D, Hober D (2015) Survival of Enveloped and Non-Enveloped Viruses on Inanimate Surfaces. *Microbes Environ* 30(2):140-144. <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME14145>
- 90 Lin Q, Lim JYC, Xue K, Yew PYM, Owh C, Chee PL, Loh XJ (2020) Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View (Beijing)* 1(2):e16. <https://doi.org/10.1002/viw2.16>
- 91 Kitanovski S, Horemheb-Rubio G, Adams O, Gärtner B, Lengauer T, Hoffmann D, Kaiser R, Respiratory Virus Network (2021) Rhinovirus prevalence as indicator for efficacy of measures against SARS-CoV-2. *BMC Public Health* 21(1):1178. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-11178-w>
- 92 Nisii C, Meschi S, Selleri M, Bordi L, Castilletti C, Valli MB, Lalle E, Lauria FN, Piselli P, Lanini S, Ippolito G, Di Caro A, Capobianchi MR (2010) Frequency of detection of upper respiratory tract viruses in patients tested for pandemic H1N1/09 viral infection. *J Clin Microbiol* 48(9):3383-3385.
- 93 Hombrouck A, Sabbe M, Van Casteren V, Wuillaume F, Hue D, Reynders M, Gérard C, Brochier B, Van Eldere J, Van Ranst M, Thomas I (2012) Viral aetiology of influenza-like illness in Belgium during the influenza A(H1N1)2009 pandemic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(6):999-1007. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1398-4>
- 94 Watanabe ASA, Carraro E, Moreira L, Camargo C, Sinohara J, Puerari D, Guatara S, Celso Granato C, Bellei N (2011) Respiratory virus infections among hospitalized patients with suspected influenza A H1N1 2009 virus during the first pandemic wave in Brazil. *Braz J Infect Dis* 15(3):220-224. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000300007>
- 95 Navarro-Mari JM, Pérez-Ruiz M, Galán Montemayor JC, Marcos Maeso MÁ, Reina J, de Oña Navarro M, Cilla Eguiluz CG (2012) Circulation of other respiratory viruses and viral co-infection during the 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(12\)70101-5](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(12)70101-5)
- 96 Pascalis H, Tenmam S, Turpin M, Rollet O, Flahault A, Carrat F, de Lamballerie X, Gérardin P, Dellagi K (2012) Intense co-circulation of non-influenza respiratory viruses during the first wave of pandemic influenza pH1N1/2009: a cohort study in Reunion Island. *PLoS One* 7(9):e44755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044755>
- 97 Pierangeli A, Scagnolari C, Selvaggi C, Monteleone K, Verzaro S, Nenna R, Cangiano G, Moretti C, Papoff P, Antonelli G, Midulla F (2012) Virological and clinical characterization of respiratory infections in children attending an emergency department during the first autumn-winter circulation of pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus. *Clin Microbiol Infect* 18(4):366-373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03590.x>
- 98 Gröndahl B, Ankermann T, von Bismarck P, Rockahr S, Kowalzik F, Gehring S, Meyer C, Knuf M, Puppe W (2014) The 2009 pandemic influenza A(H1N1) coincides with changes in the epidemiology of other viral pathogens causing acute respiratory tract infections in children. *Infection* 42(2):303-308. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0545-5>
- 99 Casalegno JS, Ottmann M, Bouscambert-Duchamp M, Valette M, Morfin F, Lina B (2010) Impact of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic wave on the pattern of hibernial respiratory virus epidemics, France, 2009. *Euro Surveill* 15(6):19485

APÊNDICE C – Trabalho premiado e resumo publicado em anais do XVI Congresso Médico Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora – COVID longa e suas implicações neurológicas

REVISTA MÉDICA DE MINAS GERAIS

Resumo

COVID LONGA E SUAS IMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS

Julia Abade¹ , Aripuanã Watanabe¹ , Sólton Batista Nunes¹ , Matheus Detogni¹,
Eva Maria de Assis Carvalho¹

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora-MG

Autor correspondente:
Julia Abade. E-mail:
juliaabade@hotmail.com

INTRODUÇÃO: Desde a sua identificação em Dezembro de 2019 o SARS-CoV-2 têm sido objeto de estudos para o melhor conhecimento da sua fisiologia viral, patogênese, epidemiologia, tratamento e vacinas. Após a fase mais aguda da pandemia uma outra preocupação surgiu entre os pesquisadores do mundo todo, as sequelas pós-infecção. Neste contexto foi identificada uma nova síndrome que recebeu o nome de COVID longa. A COVID longa pode ser definida como a doença que ocorre em indivíduos com histórico de infecção provável ou confirmada por SARS-CoV-2, geralmente dentro de 3 meses após o início da COVID-19, com sintomas que duram por pelo menos 2 meses e não podem ser explicados por um diagnóstico alternativo. Atualmente são conhecidos mais de 50 sintomas associados à COVID longa, e dentro deste espectro clínico chama a atenção os problemas neurológicos. Nacionalmente dados sobre sintomas neurológicos na COVID longa são escassos e existe a carência de diversos tipos de informação sobre o impacto desses sintomas nos pacientes afetados. **OBJETIVO:** Realizar uma revisão narrativa dos principais impactos e atualizações sobre os sintomas neurológicos da COVID longa. **MÉTODO:** Foi realizada uma busca avançada nas bases de dados Pubmed, Scielo e Google Scholar, utilizando-se os termos limitadores COVID longa e sintomas neurológicos durante o período de 2020 a 2023. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:** O espectro de sintomas apresentados pelos pacientes com COVID longa é bastante heterogêneo, porém sintomas como fadiga, dispnéia, mialgia, anormalidades cardíacas, distúrbios cognitivos e sintomas neurológicos são descritos com maior frequência. Dentre os sintomas neurológicos as principais ocorrências são de anosmia, disgeusia, dor de cabeça, problemas auditivos, confusão mental (brain fog), problemas cognitivos (dificuldade de concentração, atenção, memória e linguagem) e problemas na barreira hematoencefálica (neuroinflamação e trombo-inflamação). A fisiopatologia dos sintomas neurológicos ainda não é bem definida, mas estudos apontam para dois mecanismos gerais: dano direto e dano indireto ao sistema nervoso. O dano direto resulta da infecção de células do sistema nervoso, como é o caso da anosmia e disgeusia, porém o efeito direto do vírus no sistema nervoso central permanece desconhecido. Os mecanismos de dano indireto podem ser resultado de um estado de hiperinflamação ou hipercoagulação (tempestade de citocinas e eventos trombóticos), danos a barreira hematoencefálica (permeabilidade alterada), inflamação crônica do tronco encefálico (disfunção autônoma), e neuroinflamação (danos cognitivos). **CONSIDERAÇÕES FINAIS:** Os desafios da patogênese e das manifestações neurológicas da COVID longa revelam-se como um problema urgente e atual, com a disfunção das células neurogliais, lesões cerebrais, e alterações na barreira hematoencefálica desempenhando um papel essencial nessa complexa síndrome. Estudos neuropatológicos podem ser um caminho promissor, embora ainda haja muito a se desvendar. Sendo assim as manifestações neurológicas da COVID longa representam uma complicação clínica significativa, afetando uma parcela substancial dos pacientes com sintomas persistentes após a infecção aguda. As opções terapêuticas são escassas, destacando a necessidade de ensaios clínicos dedicados ao desenvolvimento de novos tratamentos. A COVID longa é uma doença complexa, resultado de uma ampla gama de mecanismos patogênicos e que necessita de um entendimento mais aprofundado e completo.

Palavras-chave: COVID longa. Sintomas neurológicos. SARS-COV-2.

REFERÊNCIAS:

1. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. Nat Rev Microbiol. 2023 Mar;21(3):133-146.
2. Crook H, Raza S, Nowell J, Young M, Edison P. Long covid-mechanisms, risk factors, and management. BMJ. 2021 Jul 26;374:n1648.
3. Wesselingh R. Prevalence, pathogenesis and spectrum of neurological symptoms in COVID-19 and post-COVID-19 syndrome: a narrative review. Med J Aust. 2023 Sep 4;219(5):230-236.
4. Carod-Artal FJ, García-Moncó JC. Epidemiology, pathophysiology, and classification of the neurological symptoms of post-COVID-19 syndrome. Neurol Perspect. 2021 Dec;1:S5-S15.
5. Leng A, Shah M, Ahmad SA, Premraj L, Wildi K, Li Bassi G, *et al*. Pathogenesis Underlying Neurological Manifestations of Long COVID Syndrome and Potential Therapeutics. Cells. 2023 Mar 6;12(5):816.

Apêndice D – Artigo submetido – Ocorrência de Rinovírus Humano e Vírus Sincicial Respiratório em Amostras Negativas para SARS-CoV-2 (2020-2021) em Juiz de Fora e Região: Um Estudo Transversal

Epidemiologia e Serviços de Saúde

Epidemiologia e Serviços de Saúde



REVISTA DO SUS

Ocorrência de rinovírus humano e vírus sincicial respiratório em amostras negativas para presença de SARS-CoV-2

Journal:	<i>Epidemiologia e Serviços de Saúde</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Infecções respiratórias, Rinovírus, Síndrome respiratória aguda grave, Vírus sincicial respiratório humano, Técnicas de diagnóstico molecular

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/ress-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Modalidade: artigo original

Título: Ocorrência de Rinovírus Humano e Vírus Sincicial Respiratório em Amostras Negativas para SARS-CoV-2 (2020-2021) em Juiz de Fora e Região: Um Estudo Transversal

Resumo

Objetivo: Avaliar a presença de rinovírus (HRV) e vírus sincicial respiratório (RSV) em amostras da população infantil, adulta e idosa, com resultados prévios negativos para infecção por SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). **Métodos:** Estudo transversal, retrospectivo e comparativo, que analisou dados das fichas de notificação e amostras de pacientes testados para COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) no Centro de Estudos em Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora entre maio de 2020 e agosto 2021. As médias foram comparadas por teste t de Student. Para comparação de frequências entre grupos utilizou-se tabelas de contingência 2x2 e teste exato de Fisher. **Resultados:** Foram analisadas 134 amostras e fichas de notificação, sendo 42 da população infantil, 48 da população adulta e 44 da população idosa. 14 amostras foram positivas para HRV (10,4%) e 4 positivas para RSV (3%). Positivos para HRV apresentavam idade menor em comparação com os negativos ($p=0,019$). O sintoma febre foi mais frequente nos pacientes positivos ($p=0,019$) e foi mais comum em crianças do que adultos positivos para HRV ($p=0,047$). **Conclusão:** Observou-se amostras positivas para HRV nas três faixas etárias analisadas, mostrando que o vírus continuou circulando durante a pandemia. Foram detectados poucos casos de RSV. Pacientes positivos para HRV são mais jovens em comparação com os negativos e, entre estes, febre é um sintoma mais frequente. É importante que haja um diagnóstico diferencial que possa distinguir com maior acurácia a COVID-19 de outras infecções respiratórias virais, já que o quadro clínico pode ser muito semelhante.

Palavras-chave: Infecções Respiratórias; Rinovírus; Síndrome Respiratória Aguda Grave; Técnicas de Diagnóstico Molecular; Vírus Sincicial Respiratório Humano.

Aspectos éticos:

A presente pesquisa respeitou os princípios éticos, obtendo os seguintes dados de aprovação:

Comitê de ética em pesquisa	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Número do parecer	5.550.449 e 5.551.756
Data de aprovação	28/07/2022 e 29/07/2022
Certificado de apresentação de apreciação ética	59257722.7.0000.5147 e 59261522.0.0000.5147

Termo de consentimento livre e esclarecido	Dispensado
--	------------

Introdução

No final do ano de 2019, um coronavírus até então desconhecido foi identificado como causador de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) em vários pacientes em Wuhan, China. O vírus se espalhou mundialmente sendo designado SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) e a doença associada denominada COVID-19 (*Coronavirus Disease 19*). Em março de 2020 a Organização Mundial de Saúde declarou pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Desde então, medidas foram implementadas mundialmente com o intuito de conter a transmissão do vírus. Até o momento a COVID-19 causou mais de sete milhões de mortes em todo o mundo (1) e impactou diretamente os sistemas de saúde, a circulação de pessoas e a economia global.

O SARS-CoV-2 foi o principal vírus em circulação durante a pandemia, no entanto, outros vírus podem estar envolvidos na etiologia da SRAG, como o influenza, o rinovírus humano (HRV) e o vírus sincicial respiratório (RSV). O RSV é particularmente relevante, sendo o principal causador de doenças respiratórias graves em crianças pequenas e idosos acima de sessenta anos (2).

O RSV pertence à família *Pneumoviridae* (3) e causa sintomas típicos de resfriado na maioria dos casos, porém, representa um grande risco para crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (4). O RSV possui como material genético RNA de fita simples e compreende dois subtipos, A e B (5). A transmissão ocorre via aerossóis, gotículas de saliva ou fômites, sendo muito comum em crianças pequenas, sobretudo as menores de cinco anos, devido ao compartilhamento de objetos contaminados e da proximidade constante com outras crianças em instituições de ensino como creches (6). A circulação do vírus no hemisfério sul é sazonal, ocorrendo principalmente nos meses de outono (7). O HRV causa o resfriado comum e é responsável por mais da metade dos casos de infecções agudas do trato respiratório superior (8). Os HRVs são vírus de RNA de fita simples, pertencentes à família *Picornaviridae*. O HRV comumente causa infecções leves e autolimitadas, entretanto, também pode estar associado a quadros mais graves, como bronquiolite e pneumonia, principalmente em idosos, crianças e pessoas imunocomprometidas (9). O HRV ocorre mundialmente e circula durante todo o ano no Brasil, com aumento de ocorrência nos meses de inverno (10). O vírus é transmitido principalmente por contato direto com uma pessoa infectada ou contato com superfícies contaminadas, onde a partícula viral permanece viável por algumas horas (11).

Pacientes com sintomas semelhantes aos da COVID-19 podem ter infecções causadas por outros patógenos. A preocupação global com a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 colocou outros vírus respiratórios em uma situação de descuido (12). A investigação da presença de outros vírus em amostras testadas para SARS-CoV-2 demonstrou que em até 94% das amostras negativas para COVID-19 pode-se encontrar pelo menos um outro microrganismo (13,14). Em 66% de amostras negativas para SARS-CoV-2 coletadas no Brasil em 2020, pelo menos um outro agente etiológico foi encontrado, sendo o HRV o mais prevalente (presente em 28% das amostras) (15).

É de grande relevância a busca por outras etiologias em casos suspeitos de COVID-19, uma vez que os sintomas da doença podem ser muito semelhantes a infecções por outros vírus respiratórios. O conhecimento do agente causador da doença pode melhorar o prognóstico, o manejo clínico e medidas de isolamento mais apropriadas (14,15). Esse conhecimento também permite obter maiores informações a respeito da patogênese das infecções respiratórias virais agudas.

O objetivo do estudo foi avaliar a presença de HRV e RSV em amostras da população infantil, adulta e idosa, cujos testes foram previamente negativos para infecção por SARS-CoV-2.

Métodos

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo e comparativo, realizado na cidade de Juiz de Fora, no ano de 2024. Foram analisadas amostras e fichas de notificação obtidas entre maio de 2020 e agosto 2021. As amostras foram previamente coletadas através de swab de nasofaringe de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de SRAG para que fosse realizada a testagem para SARS-CoV-2. As amostras fizeram parte da ação promovida pela Universidade Federal de Juiz de Fora em parceria com a Prefeitura de Juiz de Fora para o diagnóstico molecular da COVID-19. O Instituto de Ciência Biológicas participou da ação através da disponibilização do Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC) para realização dos testes. As fichas de notificação foram preenchidas pelos profissionais de saúde no momento da coleta da amostra. Essas fichas contêm dados pessoais, sinais e sintomas no momento da infecção, comorbidades e se houve ou não internação. O trabalho tem aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, sob os números 59257722.7.0000.5147 e 59261522.0.0000.5147.

Adotou-se como critério de inclusão pacientes que tiveram resultado negativo da PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR) para SARS-CoV-2 e que possuem idade compatível com os grupos definidos na metodologia. Esses dados foram obtidos através do banco de dados de amostras interno. Foram selecionados 150 pacientes, sendo 50 crianças (0-14 anos de idade), 50 adultos (15-59 anos de idade) e 50 idosos (acima de 60 anos). A seleção foi feita através da escolha aleatória das fichas de notificação dentro de cada faixa etária definida anteriormente, respeitando os critérios de inclusão. Pacientes cujas amostras armazenadas não tinham volume suficiente para realização dos testes foram excluídos das análises. Todas as amostras avaliadas para a presença do SARS-CoV-2 são provenientes de pacientes atendidos no Sistema Único de Saúde de Juiz de Fora e região.

As amostras já extraídas foram armazenadas em alíquotas em freezer a -80° C. O RNA viral foi extraído utilizando kit de extração (PureLink™ RNA Mini Kit, ThermoFisher), de acordo com as recomendações do fabricante. Realizou-se RT-qPCR para a detecção dos rinovírus e vírus sincicial respiratório. Inicialmente, realizou-se a padronização de um protocolo de RT-qPCR para a detecção desses vírus, em que foram testadas diferentes concentrações dos reagentes. Utilizou-se um protocolo baseado na utilização do corante intercalante de DNA SYTO 9, tendo como base o trabalho de Monis *et al* (16). Para a padronização deste protocolo, inicialmente, testou-se diferentes concentrações do SYTO 9, utilizando-se nas reações as concentrações de 2 µM, 3,5 µM e 4 µM do reagente. A reação foi padronizada com a concentração de 3,5 µM. Para a detecção do HRV foram utilizados os primers forward 5'- ACM GTG TYC TAG CCT GCG TGG C - 3' e reverse 5' - GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA GT - 3',

previamente descritos por Martins *et al.* (17), a uma concentração de 0,5 μ M. Também foram utilizados primers previamente descritos (18) para a detecção do RSV, também a uma concentração de 0,5 μ M, com as seguintes sequências: RSV-A forward 5'-CATCCAGCAAATACACCATCCA e RSV-A reverse 5'-TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAA-3'; RSV-B forward 5'-CTGTCATCCAGCAAATACACTATTCA-3' e RSV-B reverse 5'-GCACATCATAATTGGGAGTGTCA-3'. Os primers específicos para RSV A e B foram combinados em um único tubo.

Para a reação de RT-qPCR foi utilizado kit comercial da marca BIO RAD, que já contém o master mix com os reagentes necessários para a reação, e os parâmetros de amplificação seguiram as seguintes condições: 50° C por 10 minutos para a transcrição reversa, 95° C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C e 60 segundos a 60° C. Água Milli-Q foi utilizada como branco em todas as reações. Foram utilizadas como controle positivo, amostras sabidamente positivas para a presença de HRV e de RSV.

O principal desfecho foi a detecção de HRV ou RSV nas amostras dos pacientes. Sendo o SYTO 9 um intercalante de DNA, é comum a ocorrência de amplificação inespecífica. Nesse caso, a detecção dos vírus foi feita através da análise e comparação da curva de dissociação das amostras com o respectivo controle positivo. Foram consideradas amostras positivas aquelas em uma faixa de $\pm 1^\circ$ C de diferença em relação ao controle. Buscou-se parear o número de amostras analisadas em cada faixa etária, evitando divergências entre o tamanho amostral dos grupos. Os testes estatísticos realizados contribuíram para minimizar possíveis vieses. A quantidade de amostras foi definida por conveniência, de acordo com o número de amostras dos anos de 2020 e 2021 disponíveis para utilização.

Inicialmente, os dados foram analisados de forma descritiva. Para variáveis quantitativas, foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão). Diferenças entre médias foram comparadas através do teste T de Student para amostras independentes e para comparação de proporções entre grupos foram utilizadas tabelas de contingência 2x2 e teste exato de Fisher, utilizando o software OpenEpi (19). Para as variáveis categóricas, foram calculadas as proporções e apresentadas em percentuais (%), comparando os grupos de interesse. Em todas as análises foi adotado um intervalo de confiança de 95,0%, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,050$, bicaudal. Em algumas fichas dos pacientes faltavam ou estavam incompletos os dados sobre sintomas, comorbidades, hospitalização e necessidade de internação em UTI. Os dados faltantes foram identificados durante as análises das fichas dos pacientes e foram desconsiderados dos cálculos de frequência.

Resultados

De 150 amostras selecionadas inicialmente, 16 não tinham volume suficiente para os testes de RT-qPCR. No total, foram analisadas 134 amostras e fichas de notificação, sendo 42 da população infantil, 48 da população adulta e 44 da população idosa. Do total de amostras analisadas, 118 foram coletadas em 2020 e 16 em 2021.

Figura 1 Etapas de seleção dos pacientes participantes do estudo de acordo com resultado da RT-qPCR, faixa etária e volume de amostra e número total de amostras elegíveis para participar do estudo.

Rinovírus

O HRV foi detectado em 14 amostras (10,4%), das 134 analisadas. O vírus foi detectado em seis amostras na população infantil (14,3%; fig. 2A), seis na população adulta (12,5%; fig. 2B) e apenas duas amostras na população idosa (4,5%; fig. 2C). Dos positivos para HRV, 12 foram amostras coletadas em 2020 (85,7%) e 2 em 2021 (14,3%). Não houve diferença significativa entre positivos e negativos nos anos testados.

Figura 2 Proporção de amostras positivas e negativas para HRV no grupo das crianças (A), adultos (B) e idosos (C).

Do total de amostras positivas, 50,0% eram do sexo feminino e 50,0% do sexo masculino (7/14). Já dentre as amostras negativas, 44,2% (53/120) eram do sexo masculino e 55,8% (67/120) eram do sexo feminino. Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas na proporção de indivíduos positivos e negativos em relação ao sexo. A média geral de idade para os positivos foi de 23,6 anos, enquanto para os negativos foi de 40,6 anos. As médias de idade diferiram de forma significativa ($p=0,019$) entre os pacientes positivos e negativos para HRV pelo teste t de Student (tabela 1).

*Tabela 1 Média, mediana e desvio padrão da idade de pacientes positivos e negativos para HRV e valor de p referente a comparação entre as médias de idade dos positivos e negativos pelo teste t de student. *=valor de p significativo.*

Os cinco sintomas mais frequentes nos positivos e nos negativos foram os mesmos, porém com diferentes proporções, e incluem tosse, febre, dispneia, dor de garganta e desconforto respiratório. Observou-se uma frequência maior de febre nos positivos para HRV do que nos negativos (57,1% e 28,3%, respectivamente; $p=0,019$). Para os outros sintomas, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os dois grupos (tabela 2). Também foi observada uma frequência maior de febre em crianças positivas para HRV em comparação com adultos positivos (83,3% vs. 16,7%; $p=0,047$).

*Tabela 2 Frequência dos sintomas reportados mais frequentes em pacientes positivos e negativos para HRV. *= Valor de p significativo.*

Os únicos fatores de risco para SRAG observados nos positivos foram doença cardiovascular crônica, doença neurológica crônica, asma e hipertensão arterial. Nos negativos, foram observados com maior frequência doença cardiovascular crônica, diabetes, hipertensão arterial, asma e obesidade. Não houve diferença estatística entre as comorbidades observadas nos dois grupos.

Entre os positivos, 50,0% dos pacientes necessitaram de hospitalização em contraste com 28,6% que não necessitaram. Ainda, 21,4% não informaram esse dado. Já dentre os negativos, 45,8% foram hospitalizados, 23,3% não foram e 30,8% não informaram. Não foi observada diferença significativa com relação à hospitalização entre os positivos e negativos. Entre os pacientes hospitalizados, nenhum dos casos positivos necessitou de internação e unidade de terapia intensiva (UTI) (64,3% não necessitaram e 35,7% não preencheram esse dado na ficha). Entre os negativos, 15,8% (19/120) necessitaram de

internação em UTI, 48,3% não necessitaram e 35,8% não preencheram esse dado na ficha. Não houve diferença estatística entre os dois grupos.

Vírus sincicial respiratório

Foram detectadas 4 amostras positivas (3,0%) para RSV dentre as 134 testadas. Todas as amostras positivas fazem parte da população infantil, não sendo detectado o RSV nos adultos ou idosos testados. Sendo assim, os dados dos pacientes positivos e negativos foram comparados somente na população infantil. Não foi detectada nenhuma coinfeção entre RSV e HRV. Dos positivos, três foram amostras coletadas em 2020 (75,0%) e 1 em 2021 (25,0%). Das amostras positivas para RSV, 25,0% foram do sexo masculino e 75,0% foram do sexo feminino. Já dentre as amostras negativas, 52,4% eram do sexo masculino e 38,1% eram do sexo feminino. Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas na proporção de indivíduos positivos e negativos em relação ao sexo.

Dos positivos, 75,0% tinham menos de um ano de idade. A maior idade observada foi de 6,2 anos e a menor foi de 29,2 dias. A média geral de idade para os positivos foi de 1,9 anos, enquanto para os negativos da população infantil foi de 4,2 anos. A mediana de idade, em anos, foi de 0,6 para os positivos e 2,6 para os negativos e o desvio padrão foi de 2,9 e 4,3 anos para os positivos e negativos, respectivamente. A média de idade não diferiu de forma significativa entre os dois grupos ($p>0,050$).

O sintoma mais comum nas crianças positivas para RSV foi tosse (75,0%), seguida pelos seguintes sintomas, todos na mesma proporção (50,0%): febre, baixa saturação de oxigênio, dispneia e desconforto respiratório. Já para os negativos da população infantil, os sintomas mais frequentes foram os mesmos, porém em diferentes proporções: tosse (57,9%), febre (44,7%), dispneia (34,2%), desconforto respiratório (29,0%) e baixa saturação de oxigênio (23,7%). Asma foi o único fator de risco para SRAG observado nos positivos. Já nos negativos, foram observados com maior frequência asma e prematuridade, imunodeficiência ou imunodepressão e bronquite. Não houve diferença significativa entre sintomas ou fatores de risco observados nos dois grupos.

Das quatro crianças positivas para RSV, três delas foram hospitalizadas (75,0%) e uma não preencheu esse dado na ficha. Dentre os pacientes negativos da população infantil, 60,5% necessitaram de hospitalização, 23,7% não necessitaram e 15,8% não responderam. Não houve diferença significativa com relação à hospitalização entre os positivos e negativos. Nenhum paciente positivo necessitou de internação em UTI (um não necessitou e três não preencheram esse dado na ficha). Dos negativos, 13,2% necessitaram de internação em UTI, 63,2% não necessitaram e 23,7% não responderam (tabela 3). Não houve diferença estatística entre os dois grupos. 19 pacientes negativos para HRV e para RSV necessitaram de internação em UTI, sendo 14 idosos e cinco crianças. A idade média desses pacientes é de 54,7 anos, a idade média das cinco crianças é de 16,4 dias de idade e a idade média dos 14 idosos é de 74,2 anos.

Tabela 3 Proporção de positivos e negativos para HRV e RSV hospitalizados e não hospitalizados. Não são mostrados na tabela a proporção de não respondidos/ignorados.

Discussão

Os resultados deste estudo mostram que outros vírus respiratórios, além do SARS-CoV-2, estavam envolvidos na etiologia da SRAG durante os anos iniciais da pandemia.

Também se observou que, no período analisado, o HRV foi detectado com maior frequência em comparação com o RSV. O HRV foi detectado em todas as faixas etárias, enquanto o RSV foi detectado apenas em crianças com idade inferior a 10 anos e a maioria com menos de um ano. Tais resultados eram esperados, visto que essa é a população mais afetada pelo vírus. Observou-se que a idade média dos pacientes positivos para HRV foi menor que a dos negativos, uma vez que o vírus foi mais frequente entre crianças e adultos. Constatou-se que os pacientes positivos para HRV tinham febre com maior frequência em comparação com os negativos. Neste trabalho, foram observadas sete hospitalizações entre os positivos para HRV, porém nenhuma internação em UTI. Esse vírus, classicamente não está associado a hospitalizações. Esses dados sugerem que o rinovírus pode causar infecções graves o suficiente para exigir hospitalização, mas essas infecções geralmente não evoluem para quadros que demandam cuidados intensivos. 19 pacientes negativos para HRV e RSV necessitaram de internação em UTI, sendo 14 idosos e cinco crianças, todas com idade inferior a 1 mês. Como esses pacientes também testaram negativo para SARS-CoV-2, é provável que a infecção tenha sido causada por outro vírus respiratório.

Uma das limitações deste estudo foi a ausência de testagem para outros vírus respiratórios comuns. Embora estudos tenham observado uma redução na detecção desses vírus durante a pandemia de COVID-19, seria relevante testar as amostras negativas, pois existe a possibilidade de encontrar esses patógenos em algumas amostras. Outra limitação foi o preenchimento incompleto de algumas fichas de notificação. A falta de informações sobre sintomas, comorbidades ou internação resultou na exclusão de algumas amostras de algumas análises, o que pode ter impactado os resultados.

Durante a pandemia, muitas medidas não farmacológicas foram adotadas, como uso de máscaras, distanciamento social, entre outras. Essas medidas parecem ter impactado também os padrões de circulação de outros vírus respiratórios (20). Foi possível detectar o rinovírus nas três faixas etárias analisadas, o que indica que houve circulação do vírus durante a pandemia, corroborando com outros trabalhos que sugerem que sua circulação não foi afetada durante o período (20), sendo observado até mesmo um aumento nas detecções (20,21). Em um estudo retrospectivo, Zhang *et al.* (22) comparou as taxas de testes positivos para HRV no período pré-pandêmico e durante a pandemia, na China, e observou que houve uma queda de casos no primeiro semestre de 2020 em relação aos anos anteriores seguida de um pico de casos em agosto. A taxa de positividade do HRV foi de 37%, comparado com uma média de 23% de resultados positivos em agosto de 2017 a 2019 (23). Algumas hipóteses para a persistência do HRV durante a pandemia incluem a possibilidade de o HRV ter ocupado o nicho anteriormente ocupado por outros vírus respiratórios, por conta da redução na circulação destes (20). Outra hipótese é que o HRV permaneça viável no ambiente por mais tempo, uma vez que é um vírus não envelopado e mais resistente às condições ambientais (24).

O RSV foi detectado em poucas amostras. O vírus é muito comum em crianças e é a principal causa de infecção do trato respiratório inferior nessa população, principalmente em recém-nascidos e crianças mais novas (2). Um estudo (23) com uma população amostral maior observou que a idade média dos pacientes positivos para RSV era de 5 meses e que 81% tinham menos de um ano, dado semelhante ao encontrado no presente estudo. As creches e as escolas desempenham um papel crucial na transmissão do vírus (7). Durante a pandemia de COVID-19, principalmente durante

o ano de 2020, ocorreu o fechamento dessas instituições mundialmente, o que pode ter causado queda nos diagnósticos de RSV. No Brasil, estudos mostram que houve queda nas detecções de RSV após a implementação de medidas não farmacológicas em 2020 (25,26). No mesmo ano, após a adoção de medidas de contenção à COVID-19 mais restritivas, incluindo o cancelamento de aulas presenciais, o RSV não foi mais detectado durante o ano em outros países do hemisfério sul (27). A maioria das amostras analisadas no presente trabalho foram coletadas em 2020, então é possível que isso tenha influenciado nos resultados. Futuramente, seria interessante aumentar o número de amostras e o período analisado.

O sintoma febre apresentou uma frequência maior em pacientes positivos para HRV em comparação com os negativos. Segundo Chughtai *et al* (28), a frequência de febre em profissionais de saúde com diagnóstico positivo para HRV foi de 25%. Em crianças positivas para HRV observou-se uma frequência de 69% de febre (29), valor mais próximo ao encontrado neste trabalho. A diferença entre os valores pode ocorrer pela diferença de idade das populações investigadas, o que corrobora com os resultados deste trabalho, já que a febre foi um sintoma mais frequente em crianças do que adultos. A coinfeção com dois ou mais vírus é um importante preditor de febre (28). No presente trabalho, não houve coinfeção com SARS-CoV-2 ou RSV, porém, a presença de outros vírus respiratórios não foi investigada, portanto, mantém-se essa possibilidade.

Dos 14 idosos que necessitaram de internação em UTI e tiveram resultado negativo tanto para RSV quanto para HRV, a hipótese é de que a infecção poderia estar associada ao vírus influenza, que afeta de forma significativa essa população. As fichas desses indivíduos não apresentam a informação sobre vacinação contra o vírus, o que impossibilita confirmar ou não essa hipótese sem a realização de testes. Já nas cinco crianças, todas com menos de 1 mês de idade, é mais provável que a infecção tenha sido causada por outros vírus respiratórios, como o adenovírus, metapneumovírus ou o vírus parainfluenza, todos comuns em crianças pequenas com infecções respiratórias agudas, depois do RSV (30). Os pacientes negativos para RSV e para HRV apresentaram sintomas mais frequentes semelhantes aos observados nos pacientes positivos para esses vírus, também indicando que nas amostras negativas pode haver a presença de outros vírus que causam sintomas semelhantes.

Em conclusão, observamos que o rinovírus continuou circulando durante a pandemia e que foram observados poucos casos de infecção por RSV. Pacientes positivos para HRV são mais jovens em comparação com os negativos e febre é um sintoma mais frequente nos pacientes positivos. É importante que haja um diagnóstico diferencial, clínico e laboratorial, para que se possa distinguir com maior acurácia a COVID-19 de outras infecções respiratórias virais, já que o quadro clínico, em muitos casos, pode ser muito semelhante. Com esse trabalho, foi possível contribuir para um melhor entendimento sobre a participação de outras etiologias virais respiratórias em pacientes que testaram negativo para o SARS-CoV-2.

Referências

1. World Health Organization. WHO COVID-19 dashboard: COVID-19 deaths [Internet]. Geneva: WHO; 2024 [Cited 2024 december 10]. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>.
2. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD *et al*. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017;390(10098):946-58.
3. 3 International Committee on Taxonomy of Viruses. Current ICTV Taxonomy Release [Internet]. Jena: ICTV; 2024 [Cited 2025 january 6]. Available from: <https://ictv.global/taxonomy/>.
4. Jha A, Jarvis H, Fraser C, Openshaw PJM. Respiratory Syncytial Virus. In: Hui DS, Rossi GA, Johnston SL, editors. SARS, MERS and other Viral Lung Infections. Sheffield: European Respiratory Society; 2016.
5. Vandini S, Biagi C, Lanari M. Respiratory Syncytial Virus: The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1717.
6. Jacoby P, Glass K, Moore HC. Characterizing the risk of respiratory syncytial virus in infants with older siblings: a population-based birth cohort study. *Epidemiol Infect*. 2017;145(2):266-71.
7. Obando-Pacheco P, Justicia-Grande AJ, Rivero-Calle I, Rodríguez-Tenreiro C, Sly P, Ramilo O *et al*. Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. *J Infect Dis*. 2018;217(9):1356-64.
8. Vandini S, Biagi C, Fischer M, Lanari M. Impact of Rhinovirus Infections in Children. *Viruses*. 2019;11(6):521.
9. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):135-62.
10. Watanabe ASA. Caracterização genética de rinovírus humano em amostras de populações distintas do Estado de São Paulo [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2011.
11. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. 2016;8(1):16.
12. Martínón-Torres F, González-Barcala FJ. ¿Dónde se esconde el virus respiratorio sincitial? [Where does Respiratory Syncytial Virus Hide?]. *Arch Bronconeumol*. 2022;58(4):298-9.
13. Scott SJ, Pfotenhauer B, Weiner JJ, Hilleshiem J, Khubbar M, Bhattacharyya S. Respiratory Pathogen Coinfections in SARS-CoV-2-Positive Patients in Southeastern Wisconsin: A Retrospective Analysis. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e0083121.

14. Boschiero MN, Duarte A, Palamim CVC, Alvarez AE, Mauch RM, Marson FAL. Frequency of respiratory pathogens other than SARS-CoV-2 detected during COVID-19 testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022;102(2):115576.
15. Matos AR, Motta FC, Caetano BC, Ogrzewalska M, Garcia CC, Lopes JCO *et al*. Identification of SARS-CoV-2 and additional respiratory pathogens cases under the investigation of COVID-19 initial phase in a Brazilian reference laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2020;115:e200232.
16. Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem*. 2005;340(1):24-34.
17. Martins RB, Rocha LP, Prates MM, Gagliardi TB, Biasoli B, Leite MJ *et al*. Respiratory DNA viruses are undetectable in nasopharyngeal secretions from adenotonsillectomized children. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174188.
18. Perkins SM, Webb DL, Torrance SA, El Saleeby C, Harrison LM, Aitken JA *et al*. Comparison of a real-time reverse transcriptase PCR assay and a culture technique for quantitative assessment of viral load in children naturally infected with respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2356-62.
19. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health [Internet]. [place unknown]: Openepi; 2013 [Cited 2025 January 9]. Available from: https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
20. Sullivan SG, Carlson S, Cheng AC, Chilver MB, Dwyer DE, Irwin M *et al*. Where has all the influenza gone? The impact of COVID-19 on the circulation of influenza and other respiratory viruses, Australia, March to September 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(47):2001847.
21. Park S, Michelow IC, Choe YJ. Shifting Patterns of Respiratory Virus Activity Following Social Distancing Measures for Coronavirus Disease 2019 in South Korea. *J Infect Dis*. 2021;224(11):1900-6.
22. Zhang RX, Chen DM, Qian Y, Sun Y, Zhu RN, Wang F *et al*. Surges of hospital-based rhinovirus infection during the 2020 coronavirus disease-19 (COVID-19) pandemic in Beijing, China. *World J Pediatr*. 2021;17(6):590-6.
23. Tabor DE, Fernandes F, Langedijk AC, Wilkins D, Lebbink RJ, Tovchigrechko A *et al*. Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus from the 2017-2018 INFORM-RSV Study. *J Clin Microbiol*. 2020;59(1):e01828-20.
24. Firquet S, Beaujard S, Lobert PE, Sané F, Caloone D, Izard D *et al*. Survival of Enveloped and Non-Enveloped Viruses on Inanimate Surfaces. *Microbes Environ*. 2015; 30(2):140-4.
25. Luna LKS, Perosa DAH, Conte DD, Carvalho JMA, Alves VRG, Cruz JS *et al*. Different patterns of Influenza A and B detected during early stages of COVID-19 in a university hospital in São Paulo, Brazil. *J Infect*. 2020;81(2):e104-5.
26. Varela FH, Scotta MC, Polese-Bonatto M, Sartor ITS, Ferreira CF, Fernandes IR *et al*. Absence of detection of RSV and influenza during the COVID-19 pandemic in a Brazilian cohort: Likely role of lower transmission in the community. *J Glob Health*. 2021; 11:05007.
27. Abo YN, Clifford V, Lee LY, Costa AM, Crawford N, Wurzel D *et al*. COVID-19 public health measures and respiratory viruses in children in Melbourne. *J Paediatr Child Health*. 2021; 57(12):1886-1892.

28. Chughtai AA, Wang Q, Dung TC, Macintyre CR. The presence of fever in adults with influenza and other viral respiratory infections. *Epidemiol Infect.* 2017; 145(1):148-55.

29. Castañeda-Ribeyro A, Martins-Luna J, Verne E, Aguila-Luis MA, Silva-Caso W, Ugarte C *et al.* High prevalence and clinical characteristics of respiratory infection by human rhinovirus in children from Lima-Peru during years 2009-2010. *PLoS One.* 2022;17(7):e0271044.

30. De Conto F, Conversano F, Medici MC, Ferraglia F, Pinardi F, Arcangeletti MC *et al.* Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infection in a 3-year hospital-based survey in Northern Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;94(3):260-7.

Figuras:

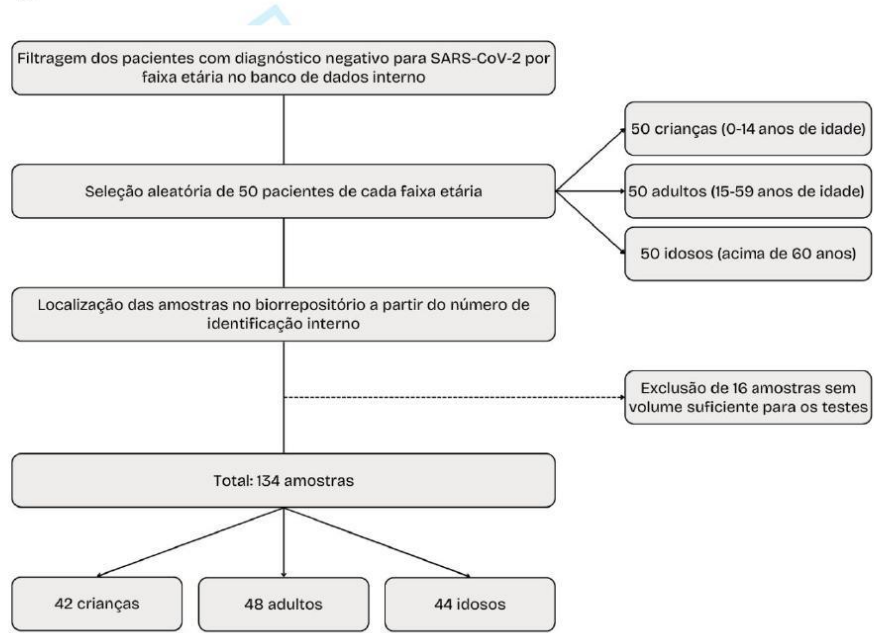


Figura 3 Etapas de seleção dos pacientes participantes do estudo de acordo com resultado da RT-qPCR, faixa etária e volume de amostra e número total de amostras elegíveis para participar do estudo.



Figura 4 Proporção de amostras positivas e negativas para HRV no grupo das crianças (A), adultos (B) e idosos (C).

Tabelas:

Tabela 4 Média, mediana e desvio padrão da idade de pacientes positivos e negativos para HRV e valor de p referente a comparação entre as médias de idade dos positivos e negativos pelo teste t de student. *=valor de p significativo.

Resultado do teste RT-qPCR para HRV	Média geral±desvio padrão (anos)	Mediana geral (anos)	População amostral
Positivo	23,6±22,7	19,5	14
Negativo	40,6±29,4	42,0	120
Valor de p	0,019*		

Tabela 5 Frequência dos sintomas reportados mais frequentes em pacientes positivos e negativos para HRV. *= Valor de p significativo.

Sintomas Infecção Por HRV	Tosse (%)	Febre (%)	Dispneia (%)	Desconforto Respiratório (%)	Dor de garganta (%)
Positivos	78,6	57,1	35,7	28,6	28,6
Negativos	60,0	28,3	41,7	33,3	29,2
Valor de p	>0,05	0,019*	>0,05	>0,05	>0,05

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tabela 6 Proporção de positivos e negativos para HRV e RSV hospitalizados e não hospitalizados. Não são mostrados na tabela a proporção de não respondidos/ignorados

Resultado do teste qPCR para HRV (população amostral)	Hospitalizados (%)	Não hospitalizados (%)	UTI (%)	Não UTI (%)
Positivos HRV (n=14)	50,0	28,6	0,0	64,3
Negativos HRV (n=120)	45,8	23,3	15,8	48,3
Positivos RSV (n=4)	75,0	0,0	0,0	25,0
Negativos RSV (n=38)	60,5	23,7	13,2	63,2



Critérios SciELO Brasil

Formulário sobre Conformidade com a Ciência Aberta

versão 29 de junho de 2020

Por meio deste formulário os autores informam o periódico sobre a conformidade do manuscrito com as práticas de comunicação da Ciência Aberta. Os autores são solicitados a informar: (a) se o manuscrito é um preprint e, em caso positivo, sua localização; (b) se dados, códigos de programas e outros materiais subjacentes ao texto do manuscrito estão devidamente citados e referenciados; e, (c) se aceitam opções de abertura no processo de avaliação por pares.

Preprints

Depósito do manuscrito em um servidor de preprints reconhecido pelo periódico.

O manuscrito é um preprint?	
☐	Sim - Nome do servidor de Preprints: DOI do Preprint:
☒	Não

Disponibilidade de Dados de Pesquisa e outros Materiais

Autores são encorajados a disponibilizar todos os conteúdos (dados, códigos de programa e outros materiais) subjacentes ao texto do manuscrito anteriormente ou no momento da publicação. Exceções são permitidas em casos de questões legais e éticas. O objetivo é facilitar a avaliação do manuscrito e, se aprovado, contribuir para a preservação e reuso dos conteúdos e a reprodutibilidade das pesquisas.

Os conteúdos subjacentes ao texto do manuscrito já estão disponíveis em sua totalidade e sem restrições ou assim estarão no momento da publicação?	
☒	Sim: ☐ os conteúdos subjacentes ao texto da pesquisa estão contidos no manuscrito ☐ os conteúdos já estão disponíveis ☒ os conteúdos estarão disponíveis no momento da publicação do artigo Segue títulos e respectivas URLs, números de acesso ou DOIs dos arquivos dos conteúdos subjacentes ao texto do artigo (use uma linha para cada dado):
☐	Não: ☐ dados estão disponíveis sob demanda dos pareceristas ☐ após a publicação os dados estarão disponíveis sob demanda aos autores – condição justificada no manuscrito ☐ os dados não podem ser disponibilizados publicamente. Justifique a seguir:

Aberturas na avaliação por pares

Os autores poderão optar por um ou mais meios de abertura do processo de *peer review* oferecidos pelo periódico.

Quando oferecida a opção, os autores concordam com a publicação dos pareceres da avaliação de aprovação do manuscrito?	
☐	Sim
☒	Não
Quando oferecida a opção, os autores concordam em interagir diretamente com pareceristas responsáveis pela avaliação do manuscrito?	
☐	Sim https://mc04.manuscriptcentral.com/ress-scielo
☒	Não

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

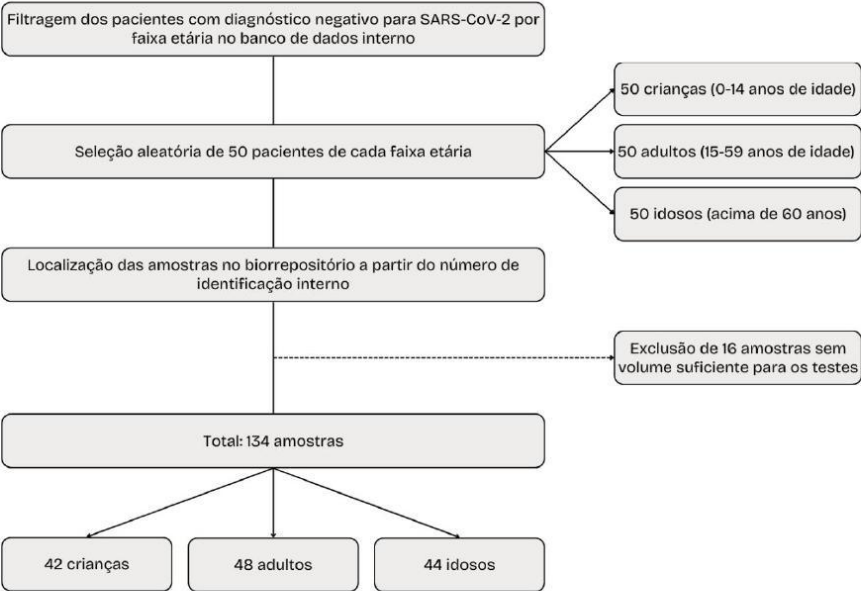


Figura 1 Etapas de seleção dos pacientes participantes do estudo de acordo com resultado da RT-qPCR, faixa etária e volume de amostra e número total de amostras elegíveis para participar do estudo.

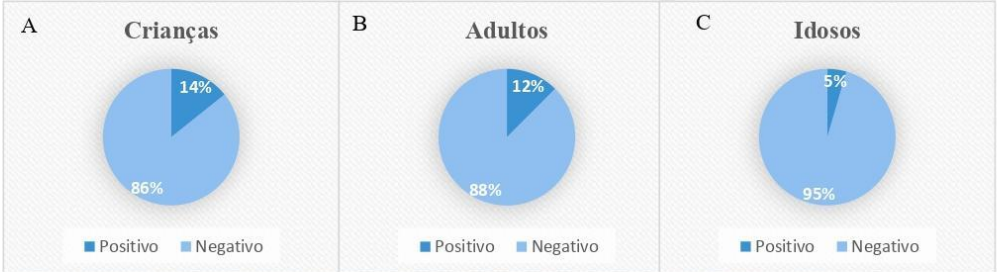


Figura 1 Proporção de amostras positivas e negativas para HRV no grupo das crianças (A), adultos (B) e idosos (C).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

*Tabela 1 Média, mediana e desvio padrão da idade de pacientes positivos e negativos para HRV e valor de p referente a comparação entre as médias de idade dos positivos e negativos pelo teste t de student. *=valor de p significativo.*

Resultado do teste RT-qPCR para HRV	Média geral±desvio padrão (anos)	Mediana geral (anos)	População amostral
Positivo	23,6±22,7	19,5	14
Negativo	40,6±29,4	42,0	120
Valor de p	0,019*		

Tabela 1 Frequência dos sintomas reportados mais frequentes em pacientes positivos e negativos para HRV. *= Valor de p significativo.

Sintomas Infecção Por HRV	Tosse (%)	Febre (%)	Dispneia (%)	Desconforto Respiratório (%)	Dor de garganta (%)
Positivos	78,6	57,1	35,7	28,6	28,6
Negativos	60,0	28,3	41,7	33,3	29,2
Valor de p	>0,05	0,019*	>0,05	>0,05	>0,05

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Tabela 1 Proporção de positivos e negativos para HRV e RSV hospitalizados e não hospitalizados. Não são mostrados na tabela a proporção de não respondidos/ignorados.

Resultado do teste qPCR para HRV (população amostral)	Hospitalizados (%)	Não hospitalizados (%)	UTI (%)	Não UTI (%)
Positivos HRV (n=14)	50,0	28,6	0,0	64,3
Negativos HRV (n=120)	45,8	23,3	15,8	48,3
Positivos RSV (n=4)	75,0	0,0	0,0	25,0
Negativos RSV (n=38)	60,5	23,7	13,2	63,2