

Universidade Feevale

Mestrado Acadêmico em Virologia

Vírus respiratórios em amostras clínicas de indivíduos com suspeita de Síndrome Respiratória Aguda Grave durante a pandemia de SARS-CoV-2 em 2020

Ana Karolina Antunes Eisen

Linha de pesquisa: Diagnóstico em Virologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki

Março de 2021

Ana Karolina Antunes Eisen

Vírus respiratórios em amostras clínicas de indivíduos com suspeita de Síndrome Respiratória Aguda Grave durante a pandemia de SARS-CoV-2 em 2020

Dissertação elaborada e apresentada ao curso Mestrado Acadêmico em Virologia, como requisito para obtenção do título de mestre.

Novo Hamburgo
2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Eisen, Ana Karolina Antunes.

Vírus respiratórios em amostras clínicas de indivíduos com suspeita de Síndrome Respiratória Aguda Grave durante a pandemia de SARS-CoV-2 em 2020 / Ana Karolina Antunes Eisen. – 2021.

36 f.; il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Virologia) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2021.

Inclui bibliografia.

“Orientador: Pro^ª. Dr. Fernando Rosado Spilki”.

1. COVID-19. 2. SRAG. 3. Inluênza. 4. Rinovírus. I. Título.

CDU 578

Bibliotecária responsável: Tatiane de Oliveira Bourscheidt – CRB 10/2012

RESUMO

Os influenzavírus A e B (FLUAV/FLUBV) são dois dos principais agentes etiológicos de doenças respiratórias agudas e da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) todos os anos, junto com outros vírus respiratórios, como adenovírus humanos (HAdV). Porém, as medidas preventivas tomadas pela população para evitar o adoecimento pela COVID-19, como o uso de máscara em lugares externos ao domicílio, o distanciamento social, o isolamento de pessoas sintomáticas, a higienização frequente das mãos e, no caso dos influenza, uma aderência aumentada à vacinação, podem ter surtido efeito na circulação de FLUV e de outros vírus respiratórios. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi o de examinar a frequência dos vírus FLUAV, FLUBV, HAdV da espécie C (HAdV-C) e Rinovírus humanos (RV) em comparação com o SARS-CoV-2 em pacientes hospitalizados suspeitos de COVID-19 com casos de SRAG ao longo dos meses de março a dezembro de 2020, além de detectar possíveis coinfeções virais entre estes. Para isto, 987 amostras de pacientes com SRAG foram analisadas para SARS-CoV-2, FLUAV, FLUBV e HAdV-C, e um menor número amostral foi também analisada para RV e enterovírus D68 (EV-D68). Amostras clínicas (987) de *swab* oro-nasofaríngeo ou lavado broncoalveolar foram analisadas para detecção parcial do genoma viral através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR). Um total de 418 (42.3%) amostras foram positivas para SARS-CoV-2, para RV 1/2 55 (de 277 testadas) foram positivas (26.3%), 37 amostras (de 272) para RV 2/2 (13.6%), 67 (6.78%) amostras foram positivas para HAdV-C, apenas 16 (1.62%) amostras foram positivas para FLUAV e nenhuma amostra foi positiva para FLUBV ou EV-68. Diversas coinfeções foram identificadas entre os vírus detectados incluindo o SARS-CoV-2, além de uma coinfeção tripla com SARS-CoV-2, FLUAV e HAdV-C. Estes achados apontam que a circulação de FLUV foi consideravelmente menor em casos de SRAG em relação a anos anteriores quando não havia o hábito do uso de máscaras pela população, a alta aderência na vacinação de gripe e os demais cuidados preventivos para COVID-19 provavelmente foram os principais responsáveis por esta diminuição.

PALAVRAS-CHAVE: COVID-19, SRAG, influenza, rinovirus, HAdV-C.

ABSTRACT

Influenzavirus A and B (FLUAV/FLUBV) are major aetiological agents of acute respiratory diseases and acute respiratory distress syndrome (ARDS) every year, together with other respiratory viruses, like human adenovirus (HAdV). However, preventive measures taken by the population to avoid getting sick with COVID-19, like use of masks, social distancing, isolation of symptomatic people, frequent hand washing and for influenza the greater adherence to vaccination, must have had an effect in FLUV circulation and in other respiratory viruses. Thus, the goal of this work was to evaluate the frequency of the FLUAV, FLUBV, HAdV from C species (HAdV-C) and Human rhinovirus (RV) comparing to the SARS-CoV-2 among hospitalized patients suspected of COVID-19 with ARDS over the months March to December, 2020, in addition to detect possible viral coinfections. To this end, 987 samples of patients with ARDS were analyzed for SARS-CoV-2, FLUAV, FLUBV and HAdV-C, and a smaller number was also analyzed for RV and enterovirus D68 (EV-D68). Respiratory clinical samples (987) of swab oronasopharyngeal or bronchoalveolar lavage were analyzed for partial genome detection through reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). A total of 418 (42.3%) samples were positive for SARS-CoV-2, 55 samples were positive for RV 1/2 (26.3%) and 37 for RV 2/2 (13.6%), 67 (6.78%) samples were positive for HAdV-C, only 16 (1.62%) samples were positive for FLUAV and no sample was positive for FLUBV or EV-68. Several coinfections were identified among detected viruses including SARS-CoV-2, as well as a triple coinfection with SARS-CoV-2, FLUAV and HAdV-C. These findings point to a lower FLUV circulation in ARDS patients, compared to previous years, when the use of masks was not usual by the population, high adherence to influenza vaccination and other preventive measures taken for COVID-19 were probably the main responsible.

KEY WORDS: COVID-19, ARDS, influenza, rhinovirus, HAdV-C.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1.1 Coronavírus	8
1.2 Influenza.....	9
1.3 Adenovírus	11
1.4 Enterovírus	12
1.5 Síndrome Respiratória Aguda Grave.....	13
1.6 Patogênese da SRAG por Influenza e SARS-CoV-2	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 ARTIGO	17
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
5 REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO GERAL

A pneumonia de etiologia inicialmente desconhecida surgiu no final de 2019 e logo foi identificada como a COVID-19, doença causada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV-2) (ICTV, 2020; WHO, 2020a). A última vez em que houve uma pandemia nas proporções da atual foi há cerca de 100 anos, na Gripe Espanhola de 1918 – 1920, causada pelo *Influenza A virus* (FLUAV) H1N1, o qual estima-se que tenha causado mais de 500 milhões de casos e até 50 milhões óbitos, em uma época onde ainda não havia nem antibióticos disponíveis, o que provavelmente dificultou o esforço de tratamento de infecções bacterianas secundárias, agravando o quadro geral e os efeitos sobre a política pública (TAUBENBERGER; MORENS, 2006).

Atualmente a COVID-19 soma mais de 96 milhões de casos ao redor do mundo com mais de 2 milhões de mortes, além de causar superlotação de unidades de terapia intensiva (UTI) e esgotamento dos sistemas de saúde, mesmo com os avanços científicos e médicos disponíveis, tendo passado pouco mais de um ano desde o seu início em Wuhan, na China (WHO, 2020b). A doença chegou ao Brasil pelo final de fevereiro de 2020 e foi declarada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março (WHO, 2020c), quando chegou também ao estado do Rio Grande do Sul, que até 14 de janeiro de 2021 contava com mais de 520 mil casos confirmados e mais de 10 mil óbitos acumulados (SES-RS, 2021).

Doenças respiratórias agudas também, conhecidas como síndromes gripais, são caracterizadas pelos sintomas respiratórios clássicos como febre, calafrios, dor de cabeça, dor no corpo, mal-estar generalizado, fraqueza, tosse, espirros, dor de garganta e coriza. Possuem diversos agentes etiológicos possíveis, incluindo bactérias e vírus, entre estes últimos temos diversos agentes etiológicos virais importantes que normalmente estão presentes em pacientes hospitalizados com infecções respiratórias como os vírus influenza (FLUV), rinovírus (RV), adenovírus humanos (HAdV), enterovírus (EV), vírus sincicial respiratório (RSV), parainfluenza, coronavírus entre outros. Estes agentes também são comumente encontrados em infecções múltiplas no mesmo paciente, assim como com outros agentes infecciosos

como as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* (BELLEI et al., 2008; BEZERRA et al., 2011; GIRARDI et al., 2019; SEO et al., 2014; STRALIOTTO et al., 2002).

1.1 Coronavírus

A família *Coronaviridae* é composta por vírus envelopados com genoma de RNA fita simples (ssRNA) polaridade positiva sendo o maior genoma de RNA conhecido, medindo cerca de 26 – 32 kb o qual é lido em diversas regiões abertas de leitura (*open reading frames* – ORFs). O nucleocapsídeo apresenta disposição helicoidal, os vírions são em sua maioria esféricos e medem entre 120 – 160 nm. Possuem em seu envelope proteínas proeminentes chamadas de *spikes* (espículas), as quais na microscopia eletrônica se assemelham com coroas solares, característica que originou o nome da família (ICTV, 2011a; MICHEL et al., 2020).

Possui duas subfamílias e é dentro da *Orthocoronavirinae* que estão os seis vírus que infectam humanos. Entre eles o atual coronavírus SARS-CoV-2, que pertence à mesma espécie que o primeiro SARS-CoV que causou epidemia respiratória em 2002, a *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* do gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus* (domínio: *Riboviria*; reino: *Orthornavirae*; filo: *Pisuviricota*; classe: *Pisoniviricetes*; ordem: *Nidovirales*; subordem: *Cornidovirineae*; família: *Coronaviridae*; subfamília: *Orthocoronavirinae*). O mesmo gênero também abriga o *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (subgênero: *Merbecovirus*), outro importante vírus de doença respiratória humana que causou a epidemia de síndrome respiratória do Oriente Médio em 2012. Os outros coronavírus humanos são agentes bastante comuns de resfriados, como o coronavírus humano OC43 (*Betacoronavirus 1*), o *Human coronavirus HKU1*, pertencentes também ao gênero *Betacoronavirus*, o *Human coronavirus 229E* e o *Human coronavirus NL63*, ambos pertencentes ao gênero *Alphacoronavirus* (ICTV, 2011a, 2020).

Além disso, a mesma família e subfamília abriga também importantes vírus de animais, como por exemplo os coronavírus entérico canino, coronavírus entérico

felino, o coronavírus da peritonite infecciosa felina (ambos do gênero *Alphacoronavirus*, subgênero *Tegacovirus* e espécie *Alphacoronavirus 1*), o coronavírus equino que causa doença gastrointestinal, do gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Embecovirus* e espécie *Betacoronavirus 1* e o primeiro vírus reconhecido da família, o vírus da bronquite infecciosa aviária que possui genótipos divididos em duas espécies, a *Avian coronavirus* e a *Avian coronavirus 9203*, ambas do gênero *Gammacoronavirus* e subgênero *Igacovirus*, entre outros (HAAKE et al., 2020; ICTV, 2011a; WILLE; HOLMES, 2020).

Além de humanos e de animais domésticos os coronavírus têm também os animais silvestres como hospedeiros, sendo geralmente seus reservatórios na natureza. Os morcegos são os principais reservatórios, assim como roedores, de muitas espécies de coronavírus, sendo inclusive a origem dos epidêmicos SARS e MERS-CoV. Da mesma forma, acredita-se que a provável origem do SARS-CoV-2 tenha sido morcegos, tendo os pangolins (*Manis javanica*) também tido um papel na genética para sua origem. O SARS-CoV-2 posteriormente passou pelo processo de *spillover* para humanos, possivelmente ainda com um intermediário mamífero.

Utilizando o ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) como receptor celular, o SARS-CoV-2 é capaz de infectar células do TRS, TRI, do trato gastrointestinal, além de células de outros órgãos como coração e rim. Após a sua entrada pela orofaringe uma primeira replicação das células do TRS é responsável pela tradicional perda de olfato e paladar, e chegando ao pulmão pode então entrar na circulação periférica e acabar alcançando outros órgãos.

1.2 Influenza

Os FLUV humanos mais frequentes são das espécies *Influenza A virus* (FLUAV) e *Influenza B virus* (FLUBV), dos gêneros *Alphainfluenzavirus* e *Betainfluenzavirus*, respectivamente, ambos da família *Orthomyxoviridae* (domínio: *Riboviria*; reino: *Orthornavirae*; filo: *Negarnaviricota*; subfilo: *Polyploviricotina*; classe: *Insthoviricetes*; ordem: *Articulavirales*). São vírus envelopados pleomórficos que por vezes podem ser esféricos, medindo entre 80 – 120 nm em diâmetro. O genoma é

composto por RNAs polaridade negativa que mede entre 10 – 14.6 kb, divididas em 8 segmentos para FLUAV e FLUBV ou em 7 e 6 segmentos em outras espécies. No envelope viral estão presentes as duas principais proteínas estruturais, a hemaglutinina (HA) que é responsável pela ligação viral e fusão de membranas e a neuraminidase (NA), que atua como sialidase e realiza a clivagem da HA com o ácido siálico presente na membrana da célula hospedeira que permite a liberação dos novos vírus produzidos (ACHESON; WILEY, 2011; ICTV, 2011b).

Para os FLUAV são conhecidos até o momento 18 subtipos de HA e 11 de NA (TONG et al. 2012; TONG et al. 2013), baseado em características antigênicas. Quando em coinfeções virais com diferentes subtipos de HA e NA, estes podem sofrer o ressortimento gerando novos subtipos, processo também chamado de *shift* antigênico. Além disso, pequenas variações antigênicas, ou *drifts*, também ocorrem dentro do mesmo subtipo, o que resulta em escapes da imunidade prévia do hospedeiro e na necessidade de atualização da vacina da gripe todos os anos (DUNNING; THWAITES; OPENSHAW, 2020; ICTV, 2011b).

Sabe-se que os FLUV podem ter como hospedeiros os humanos, suínos e aves e é justamente o surgimento de um subtipo aviário ou suíno capaz de infectar humanos que causa as grandes epidemias de gripe ou surtos menores, porém de doença severa. É a afinidade com o receptor de cada hospedeiro que determina as espécies que o vírus será capaz de infectar, o α 2,3 ácido siálico é o receptor nas aves e o α 2,6 ácido siálico é o principal receptor nos humanos. Apesar de o α 2,6 ácido siálico ser o mais abundante no trato respiratório humano, principalmente no trato respiratório superior, o α 2,3 ácido siálico também está presente em algumas células no trato respiratório inferior, como é o caso dos alvéolos. Isso torna possível que FLUV aviários eventualmente infectem humanos e nestes casos geralmente vão cursar com doença severa. Por outro lado, a ausência de ou a baixa afinidade para o α 2,6 ácido siálico fará com que estes vírus não sejam eficientemente transmitidos entre humanos. Os suínos por sua vez, possuem tanto o α 2,3 quanto o α 2,6 ácido siálico, o que produz um ambiente altamente propício para FLUV aviários e de mamíferos sofrerem ressortimento e assim surgirem novos subtipos virais capazes de infectar humanos e de causarem grandes epidemias (JOSEPH et al., 2017; KUMLIM et al., 2008).

1.3 Adenovírus

Diversos sorotipos de HAdV que com frequência causam doenças respiratórias pertencem à espécie *Human mastadenovirus C* (HAdV-C) do gênero *Mastadenovirus* e família *Adenoviridae* (domínio: *Varidnaviria*; reino: *Bamfordvirae*; filo: *Preplasmiviricota*; classe: *Tectiliviricetes*; ordem: *Rowavirales*). Este gênero possui atualmente 50 espécies, sendo 7 delas de HAdV (A – G). Outras espécies também podem causar doença respiratória como a *Human mastadenovirus B*, *Human mastadenovirus D* e *Human mastadenovirus E*, outras são tipicamente entéricas como a *Human mastadenovirus F*. Dentro das espécies de HAdV, 51 sorotipos e mais de 70 genótipos já foram descritos, alguns podendo causar tanto doenças respiratórias quanto entéricas além de ceratoconjuntivites (ICTV, 2011c; III; KAJON, 2016).

Os vírus desta família não são envelopados, possuem simetria icosaédrica com proteínas fibra (*fiber*) bastante proeminentes que são características da família e medem entre 70 – 90 nm de diâmetro. O genoma é composto por DNA de fita dupla (DNAds) e mede de 26 – 48 kb, devido ao capsídeo não envelopado e ao genoma de DNAds estes vírus são resistentes no ambiente fora do hospedeiro, podendo ser transmitidos pela via-fecal oral, através de água ou alimentos contaminados e fômites, além do contato próximo através de secreções respiratórias e da fala por gotículas e aerossóis (ICTV, 2011c).

Utilizam para entrada celular diversos receptores e fatores de ligação, sendo o receptor de coxsackie e adenovírus (coxsackie and adenovirus receptor – CAR) o mais conhecido, mas também utilizam a desmogleína 2 (DSG2), o CD46, ácidos siálicos e integrinas (WOLFRUM; GREBER, 2013). Inicialmente infectam o revestimento epitelial da orofaringe, órgãos respiratórios e do trato gastrointestinal, podendo fazer viremia e atingir outros locais além do sítio primário da infecção através de leucócitos. Possuem propensão em tornarem-se persistentes em locais como amígdalas, adenoides e placas de Peyer, podendo ser reativado em imunossuprimidos. Em pacientes imunocompetentes a infecção geralmente é

autolimitada, causando doença mais frequentemente em crianças ou imunocomprometidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

1.4 Enterovírus

Enterovirus é um gênero dentro da família *Picornaviridae* (domínio: *Riboviria*; reino: *Orthornavirae*; filo: *Pisuviricota*; classe: *Pisoniviricetes*; ordem: *Picornavirales*) que abriga diversas espécies incluindo os RV humanos, estes estão atualmente categorizados nas espécies *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* e *Rhinovirus C*, os quais possuem como receptores celulares as moléculas ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) e CDHR3 (*cadherin-related family member 3*), respectivamente. Ainda dentro do mesmo gênero está o Enterovirus D68 (EV-D68) da espécie *Enterovirus D*. Os vírus desta família são pequenos, medindo entre 30 – 32 nm em diâmetro, com simetria icosaédrica, não envelopados, com genoma de RNAss polaridade positiva de 6.7 – 10 kb de extensão. Por não serem envelopados são resistentes no ambiente podendo ser transmitidos pela via fecal-oral além do contato próximo típico de infecções respiratórias. Geralmente infectam apenas uma espécie, em alguns casos podendo infectar alguns poucos hospedeiros (BASNET; PALMENBERG; GERN, 2019; ZELL et al., 2017).

Acreditava-se que os RVs eram limitados às infecções do trato respiratório superior (TRS) por replicarem melhor em temperaturas de 33 – 35°C. Porém, já foram encontrados no trato respiratório inferior (TRI), principalmente nos brônquios. Podem se disseminar por viremia, são capazes de entrar em células imunes e inclusive replicar em linfócitos B. Apesar de não causarem mudanças citopatológicas, aparentemente desfazem as junções de oclusão entre as células, causando um extravasamento vascular e secreção de muco. Desta forma, a maioria das manifestações são causados pela resposta do próprio sistema imune, visto que a infecção por RVs desencadeia a liberação de citocinas, interleucinas (IL), quimiocinas e no recrutamento de neutrófilos. Além de serem responsáveis por grande parte dos resfriados comuns, também estão associados com pneumonias adquiridas na comunidade e exacerbações de asma. Também podem estar

associados com a SRAG, apesar de ser difícil relacioná-los como causa da síndrome, visto que geralmente estão em coinfeções com outros patógenos e que estão presentes na mesma frequência tanto em pacientes com SRAG quanto em pacientes com doenças brandas (DRYSDALE; MEJIAS; RAMILO, 2017; GREENBERG, 2016; TO; YIP; YUEN, 2017).

1.5 Síndrome Respiratória Aguda Grave

As síndromes gripais podem evoluir para doenças mais severas como pneumonias e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que é composta por pneumonia com infiltrados pulmonares bilaterais e saturação de oxigênio sanguíneo abaixo de 95%, vindo acompanhada por maior fadiga e dificuldade para respirar. O Ministério da Saúde atualmente utiliza como critério para definição de SRAG que o indivíduo com sintomas de síndrome gripal apresente uma das seguintes manifestações: desconforto respiratório, pressão persistente no tórax, saturação de O₂ menor que 95% ou coloração azulada dos lábios ou rosto (MS, 2021). Quando o tratamento não é suficiente a SRAG leva à falha respiratória desencadeando em falência múltipla de órgãos, podendo levar ao óbito. Idosos e pessoas com comorbidades como asma e outras doenças respiratórias crônicas, doença renal crônica, diabetes, entre outras, apresentam maior risco para desenvolver doença severa e SRAG (RANIERI et al., 2012).

A SRAG pode ser causada por diversos agentes infecciosos, os mais frequentes no Brasil costumavam ser o FLUAV, o FLUBV, RSV e os HAdV-C. A SRAG todos os anos é importante causa de hospitalizações por quadros respiratórios, em 2019 até a semana epidemiológica (SE) 49 foram notificados 39.190 casos. Dentre os casos de SRAG que tiveram resultados de diagnóstico divulgados, 17,8% (7.556/32.048) apresentaram infecção por influenza dos quais 59,5% eram FLUAV H1N1pdm09, 12,1% eram por FLUBV e 14,9% das infecções eram por FLUAV H3N2, sendo o restante não subtipado. Além de infecção por influenza, outros 23,6% (7.556/32.048) estavam infectados com outros vírus respiratórios, 69,9% (5.283/7.556) das infecções sendo então causadas pelo RSV, representando o principal vírus respiratório identificado em casos de SRAG além dos

influenzas; adenovírus e parainfluenza também foram identificados entre estes em menor número, valores que se mantiveram equivalentes em anos anteriores (MS, 2013, 2018, 2019).

1.6 Patogênese da SRAG por Influenza e SARS-CoV-2

Quando chega aos alvéolos, as primeiras células que o FLUV entra em contato são as células epiteliais, pneumócitos tipo 1 e tipo 2. Porém, a expressão de ácidos siálicos difere entre estes dois tipos de células, sendo o α 2,6 ácido siálico expresso nos pneumócitos tipo 1, que é o receptor preferido para os FLUV humanos. Logo após infectar os pneumócitos tipo 1 o FLUV desencadeia o acúmulo de fluido no lúmen alveolar e mais tarde na infecção danifica o epitélio pelo dano direto causado pela morte das células infectadas e, também por apoptose, além disso, as células epiteliais também produzem citocinas como o TNF α que danificam a barreira epitélio-endotelial. Com o dano da barreira epitélio-endotelial, a perturbação das junções de oclusão e a ativação das células endoteliais o acúmulo de fluidos nos alvéolos aumenta e há o extravasamento de leucócitos. A presença de neutrófilos e de macrófagos ativados por sua vez causa a liberação espécies reativas de oxigênio e ainda mais citocinas e quimiocinas, como as IL-6, CXCL9, CXCL10, CCL2, interferon α e γ , que danificam ainda mais o epitélio-endotélio e atraem ainda mais leucócitos para o local. A formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos, juntamente com essa exacerbação da resposta imune, que é conhecida como tempestade de citocinas, são fatores que contribuem para o estabelecimento da SRAG causada pela infecção inicial por FLUV (SHORT et al., 2014).

Em comparação, quando o SARS-CoV-2 chega aos alvéolos este é capaz de infectar os pneumócitos tipo 2, mas também os macrófagos residentes. O próprio receptor viral, ACE2, também apresenta papel na patogênese visto que ao se ligar com a proteína S os níveis de ACE2 são diminuídos, o que diminui os efeitos protetores deste contra danos pulmonares e que desencadeia a maior produção de Ang II, que causa infiltração de macrófagos e liberação de citocinas (SONG et al., 2020), juntamente com a liberação de citocinas pelos pneumócitos e macrófagos infectados. Desta forma, ocorre então o dano à barreira epitélio-endotelial, acúmulo

de fluidos e extravasamento de leucócitos, levando à tempestade de citocinas e ao estabelecimento da SRAG de forma semelhante àquela desencadeada secundária a infecção por outros patógenos, como por FLUV. Vale ressaltar que uma importante diferença na SRAG entre FLUV e SARS-CoV-2 é que este último ainda desencadeia hipercoagulação, levando à coagulação intravascular disseminada através da ativação de plaquetas e da ativação de neutrófilos através da ligação destes formando complexos neutrófilo-plaquetas (MORRIS et al., 2020).

Devido à proporção que a COVID-19 tomou, diversas medidas de monitoramento e vigilância de síndromes respiratórias foram modificadas no ano de 2020, por exemplo com a preocupação em diagnosticar os pacientes infectados com SARS-CoV-2 o diagnóstico de influenza assim como de outros vírus provavelmente foi grandemente comprometido levando-se em conta as limitações de recursos e equipes disponíveis em laboratórios oficiais. Por outro lado, as medidas preventivas tomadas pela população especialmente na primeira onda de disseminação do SARS-CoV-2 e evitar o adoecimento pela COVID-19, como o uso de máscara em lugares externos ao domicílio, o distanciamento social, o isolamento de pessoas sintomáticas, a lavagem frequente das mãos e, no caso dos influenza uma aderência aumentada à vacinação, devem ter surtido efeito também na circulação destes outros vírus. Ao mesmo tempo, flexibilizações ocorridas ao longo do tempo e especialmente após o pico da primeira onda podem ter alterado o padrão de ocorrência de outros agentes etiológicos de doença respiratória viral que não o SARS-CoV-2.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de examinar a frequência dos vírus FLUAV, FLUBV, HAdV-C e RV em comparação com o SARS-CoV-2 em pacientes hospitalizados suspeitos de COVID-19 com casos de SRAG ao longo dos meses de março a dezembro de 2020. Também foi investigada a possibilidade de eventuais coinfeções com a participação destes diferentes vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a presença de infecções causadas por Influenza vírus A e B em amostras de pacientes com SRAG que foram enviadas para diagnóstico de SARS-CoV-2, assim como verificar a possível presença de coinfeções entre esses vírus respiratórios durante a pandemia de COVID-19.

2.2 Objetivos específicos

Detectar por qRT-PCR presença de FLUAV, FLUBV, HAdV-C, RV e EV-D68 em amostras de pacientes com SRAG suspeitos de COVID-19;

Avaliar a possível presença de coinfeções entre SARS-CoV-2, FLUAV, FLUBV, HAdV-C, RV e EV-D68;

Avaliar a circulação de FLUV e SARS-CoV-2 entre pacientes com SRAG entre os meses de março a dezembro de 2020, comparando com o regime vigente de distanciamento social adotado na região.

3 ARTIGO¹

Title: Low circulation of Influenza A and coinfection with SARS-CoV-2 among other respiratory viruses during COVID-19 pandemic in a region of southern Brazil

ABSTRACT

With the arrival of COVID-19 in Brazil in February, 2020, several preventive measures were taken by the population aiming to avoid SARS-CoV-2 infection including use of masks, social distancing and frequent hand washing, these measures may have contributed to prevent infection by also others respiratory viruses. Our goal was to determine the frequencies of Influenza A and B viruses (FLUAV/FLUBV), *Human mastadenovirus C* (HAdV-C), *Enterovirus 68* (EV-68) and *Rhinovirus* (RV) besides SARS-CoV-2 among hospitalized patients suspects of COVID-19 with cases of acute respiratory disease syndrome (ARDS) in the period of March to December, 2020 , and to detected possible coinfections among them. Nucleic acid detection was performed using Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) in respiratory samples like naso-oro-pharyngeal swabs and bronchoalveolar lavage. A total of 418 (42.3%) samples were positive for SARS-CoV-2, 16 (1.62%) samples were positive for FLUAV, no sample was positive for FLUBV or EV-68, 67 (6.78%) samples were positive for HAdV-C, 55 samples were positive for RV 1/2 (26.3%) and 37 for RV 2/2 (13.6%). Coinfections were also detected, including a triple coinfection with SARS-CoV-2, FLUAV and HAdV-C. In the present work a very low frequency of FLUV was reported among hospitalized patients with ARDS compared to the past years, probably due to preventive measures taken to avoid COVID-19 and the high influenza vaccination coverage in the region which this study was performed.

¹ Artigo submetido para a revista "Journal of Medical Virology" de fator de impacto 2.021.

1 | INTRODUCTION

By the end of 2019, scientists announced the circulation of a new type of coronavirus in China, which was later officially named SARS-CoV-2, belonging to the *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* species together with the first SARS-CoV¹. COVID-19, the disease caused by it, was linked to a seafood market in the city of Wuhan, Hubei province, and since then, the disease quickly spread around the world causing 87.589.206 confirmed cases by January 9th and 1.906.606 deaths^{2, 3, 4}. COVID-19 was rapidly declared a pandemic, in about 3 months since it is beginning. Regarding a burden for public health, the present pandemic is only comparable to the Spanish Flu back in 1918, caused by *Influenza A virus* (FLUAV) H1N1⁵.

Respiratory pathogens like viruses, bacteria and fungi are commonly found infecting the same host simultaneously, in fact coinfection with several different respiratory viruses is a common finding as well as viral-bacterial coinfection, mainly taking into account that seasonality overlaps in some of them^{6,7,8}. Among respiratory viruses, FLUAV and *Influenza B virus* (FLUBV) species are prevalent, as well as *Rhinovirus* (RV) of *Enterovirus* genus and *Human mastadenovirus C* (HAdV-C)^{8,9,10,11,12}.

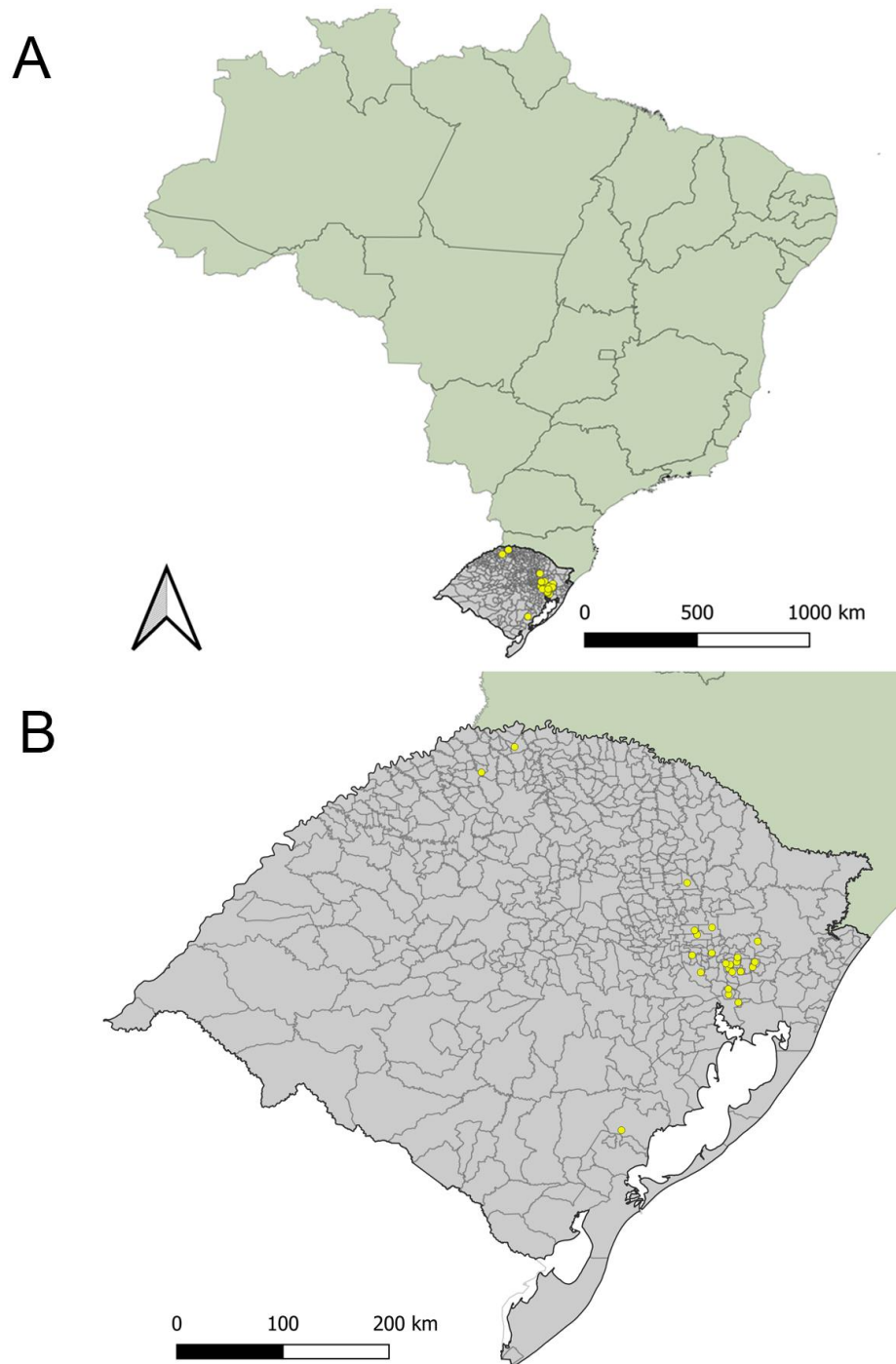
The advent of COVID-19 forced the adoption of several non-pharmacological preventive measures aiming to avoid SARS-CoV-2 infection like wearing masks, social distancing and frequent hand washing. Furthermore, as an attempt to contain COVID-19 and maintain the economy, the state government created a system of “controlled distancing” which has been updated weekly through a system of color-based risk flags that represent a low risk (yellow), medium risk (orange), high risk (red) and very high risk (black). Depending on the flag’s color, the measures required for commerce and services establishments are more restricted and some activities may be prohibited^{13,14}. These measures may have contributed to preventing infection by other respiratory viruses besides SARS-CoV-2^{15,16} and their circulation may have been reduced along their seasonal months in 2020.

Therefore, the goal of this work was to evaluate the frequency of other viral agents of respiratory illness, including FLUAV and FLUBV, RV, *Enterovirus* D68 (EV-68) and HAdV-C in samples collected from hospitalized patients suspected of acute respiratory distress syndrome (ARDS) by SARS-CoV-2 as well as to detect possible viral coinfections among them.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples

Respiratory samples from 40 different municipalities of Rio Grande do Sul (Supplementary figure 1), the southernmost state of Brazil, were received for COVID-19 molecular diagnosis in Laboratório de Microbiologia Molecular (LMM) of Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil. The criteria for sample inclusion in this study was to choose randomly among clinical samples from hospitalized patients presenting typical cases of ARDS in which COVID-19 was suspected. For this study, 987 cases were selected along a period comprising months March and December of 2020. This correspond to the previous phase of the first peak of COVID-19 cases in the region (occurred in final July), to the beginning of the second wave that started in October 2020. Respiratory samples were nasopharyngeal swabs or bronchoalveolar lavage, collected by local healthcare professional in sterile saline solution following standard guidelines and transported to the laboratory under refrigeration until 24h after sampling. This study was approved by the University's Ethical Review Board (protocol number: 33202820.7.1001.5348), following Brazilian regulations and international ethical standards.



Supplementary figure 1: A total of 40 municipalities of the 987 patients included in this study are indicated in yellow dots, being them: Alvorada, Araricá, Braga, Bom Princípio, Brochier, Campo Bom, Canoas, Carlos Barbosa, Dois Irmãos, Estância Velha, Esteio, Farroupilha, Frederico Westphallen, Garibaldi, Gramado, Harmonia, Ivoti, Lindolfo Collor, Maratá, Monte Negro, Morro Reuter, Nova Hartz, Nova Prata, Novo Hamburgo, Parobé, Presidente Lucena, Portão, Porto Alegre, Rolante, Santa Maria do Herval, São Francisco de Paula, São Leopoldo, São Sebastião do Caí, Sapiranga, Sapucaia do Sul, Taquarí, Três Coroas, Tupandí and Xangri-lá. A. Southernmost state of Brazil, in which study was carried out. B. Rio Grande do Sul state is shown in detail with municipalities divisions.

2.2 Nucleic acid extraction

Samples were stored in 4 °C until the nucleic acid extraction that was performed before completing 24 h. Extractions were made with the commercial kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied biosystems™) with the automated equipment KingFisher™ Duo Prime (ThermoFisher™). Saline was also extracted and used as a negative control of the extraction (CE) in each round to ensure the absence of contamination during this process. Nucleic acids were then stored in - 80 °C until further analysis.

2.3 Nucleic acids amplification by Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

FLUAV, FLUBV, types of FLUAV H3, SARS-CoV-2, HAdV-C, RV and EV-D68 were aimed for detection by nucleic acid amplification. The RT-qPCR reactions were made in a 25 µL total volume for FLUVs detection, being 12,5 µL of 2X RT-PCR Buffer and 1 µL of 25X Enzyme mix of AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (ThermoFisher™), 0,5 µL of each primer and probe, 5 µL of nuclease free-water (NFW) and 5 µL of sample. For SARS-CoV-2 detection reactions were made in a 20 µL total volume, being 10 and 0,8 µL of the same buffer and enzyme mix respectively, as well as 0,8 µL of each primer, 0,4 µL of probe, 2,2 µL of NFW and 5 µL of sample. Amplification cycle was the same for FLUV and SARS-CoV-2 detection, beginning in 50°C for 15 min for reverse transcription, followed by denaturation in 95°C for 10 min and by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 45 sec. For HAdV-C detection qPCR reactions were made in a 20 µL final volume, with 10 µL of Taqman® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher™), 2 µL of NFW, 1 µL of each primer and probe and 5 µL of sample. Amplification cycle was according to Wolf et al.¹⁷.

For RVs and EV-68 detection the primer-probe kit of TaqMan® Respiratory Tract Microbiota Profiling Experiments (Applied Biosystems™) was used in a total volume reaction of 15 µL, with 7,5 µL of 2X RT-PCR Buffer, 0,6 µL of 25X Enzyme mix of AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (ThermoFisher™), 0,9 µL of NFW and 1 µL of primer-probe in each independent reactions, the Human Rhinovirus 1/2, Human Rhinovirus 2/2 and Human Enterovirus D68.

In all analysis a No Template Control (NTC) was used as a negative control to ensure absence of contamination during RT-qPCR process and positive controls were also used in all plaques to ensure the effectiveness of all reactions. Positive controls used were a FLUAV swine H1N1 pandemic virus isolated in MDCK cells (FLUAV), H3N2 virus isolated in MDCK cells (H3 types), a human FLUBV isolated in MDCK cells (FLUBV), HAdV-5 isolated in A549

cells (HAdV-C) and a poliovirus 2 sample (RV).

Descriptions of primers and probes with their references can be seen in Table 1, with the exception of RVs and EV-68 which were not described in the kit of TaqMan® Respiratory Tract Microbiota Profiling Experiments.

TABLE 1: Descriptions of primers and probes used in SARS-CoV-2, FLUV and HAdV-C detection

Oligonucleotides	Sequence 5' → 3'	Concentration	References
InfA primer F	GACCRATCCTGTACCTCTGAC	40 µM	
InfA primer R	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	40 µM	CDC, 2009 ¹⁸
InfA sonda	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	10 µM	
InfB primer F	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG	40 µM	Selvaraju;
InfB primer R	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	40 µM	Selvarangan, 2010 ¹⁹
InfB sonda	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	10 µM	
pdmH1primer F	GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA	40 µM	
pdmH1 primer R	CGGGATATTCTTAATCCTGTRGC	40 µM	Rönkkö et al 2011 ²⁰
pdmH1sonda	CAGAATATACATCCRGTCACAATTGGARAA	10 µM	
pdmInfA primer F	GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG	40 µM	
pdmInfA primer R	GTGRGCTGGGTTTTTCATTTGGTC	40 µM	CDC, 2009 ¹⁸
pdmInfA sonda	CYACTGCAAGCCCATACACACAAGCAGGCA	10 µM	
H3 primer F	AAGCATTCCYAATGACAAACC	40 µM	
H3 primer R	ATTGCRCRAATATGCCTCTAGT	40 µM	Tse et al, 2011 ²¹
H3 sonda	CAGGATCACATATGGGSCCTGTCCCAG	10 µM	
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	5 µM	
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	5 µM	Corman et al, 2020 ²²
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG	5 µM	
VTB2-HAdVCf	GAGACGTACTTCAGCCTGAAT	25 µM	
VTB2-HAdVCr	GATGAACCGCAGCGTCAA	25 µM	Wolf et al. 2010 ¹⁷
VTB2-HAdVC probe	CCTACGCACGACGTGACCACAGA	15 µM	

3 | RESULTS

A total of 987 clinical samples from ARDS hospitalized patients were analyzed from March to December of 2020. Most samples were naso-oropharyngeal swabs (91.3%). Among the patients, 51.8% were male and 48.2% female from 41 different municipalities, although 46.2% of samples included in this study were from the same city, Novo Hamburgo. The patient included with the highest age was 99 years old and the lowest was 2 months old, most (59.4%) patients were elderly (>60 years old), 30.6% were adults (36-59 years old), 9.9% were young adults (19-35 years old) and 2,1% were children or teenagers (<18 years old), age and gender distribution are shown in Figure 1.

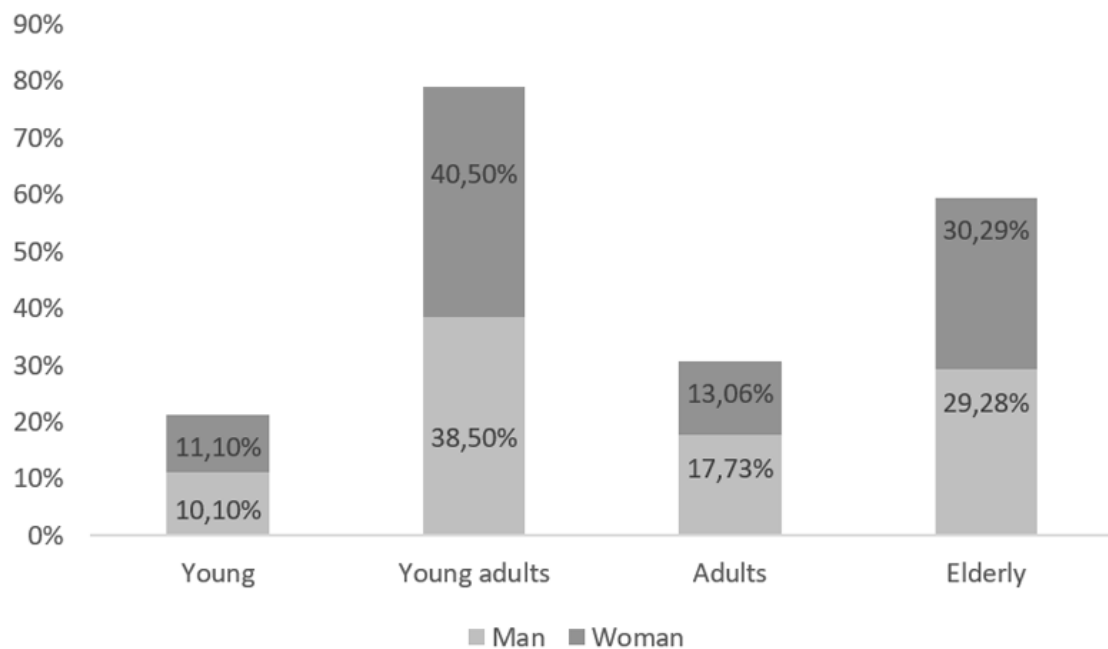


FIGURE 1: Age and gender distribution of 987 patients included in the study. Of the total, 51,8% were male and 48,2% were female, distributed further in young (≤ 18 years old), young adults (19 – 35), adults (36 – 59) and elderly (≥ 60).

Of the 987 samples included in this study, all of them were analyzed for SARS-CoV-2, FLUAVs, FLUBV and HAdV-C. For RV 1/2, 277 were analyzed, 272 for RV 2/2 and 76 for EV-68. A total of 418 (42.3%) samples were positive for SARS-CoV-2, 16 (1.62%) samples were positive for FLUAV, 15 with pdmInfA primer and one with pdmH1, no sample was positive for FLUBV or EV-68 and 67 (6.78%) samples were positive for HAdV-C. Seventy-three samples were positive for RV 1/2 (26.3%) and 37 for RV 2/2 (13.6%), these results can

be seen in Table 2 and Figure 2. Figure 4 shows positive cases for all respiratory viruses tested distributed along the year.

TABLE 2: Number of positive samples for other respiratory viruses and their percentages relative to SARS-CoV-2 positivity status

Virus	SARS-CoV-2 Results						
	Tested	Positive			Negative		
		Detected	Percent	Tested	Detected	Percent	
Influenza A	418	6	1.43 %	569	10	1.75 %	
Influenza B	418	0	0.00 %	569	0	0.00 %	
Adenovirus	418	18	4.30 %	569	49	8.61 %	
Rhinovirus 1/2*	67	18	26.8 %	210	55	26.2 %	
Rhinovirus 2/2*	73	9	12.3 %	199	28	14.1 %	
Enterovirus 68	20	0	0.00 %	56	0	0.00 %	

* Names of the primer-probe kit according to manufacturer of the commercial kit used.

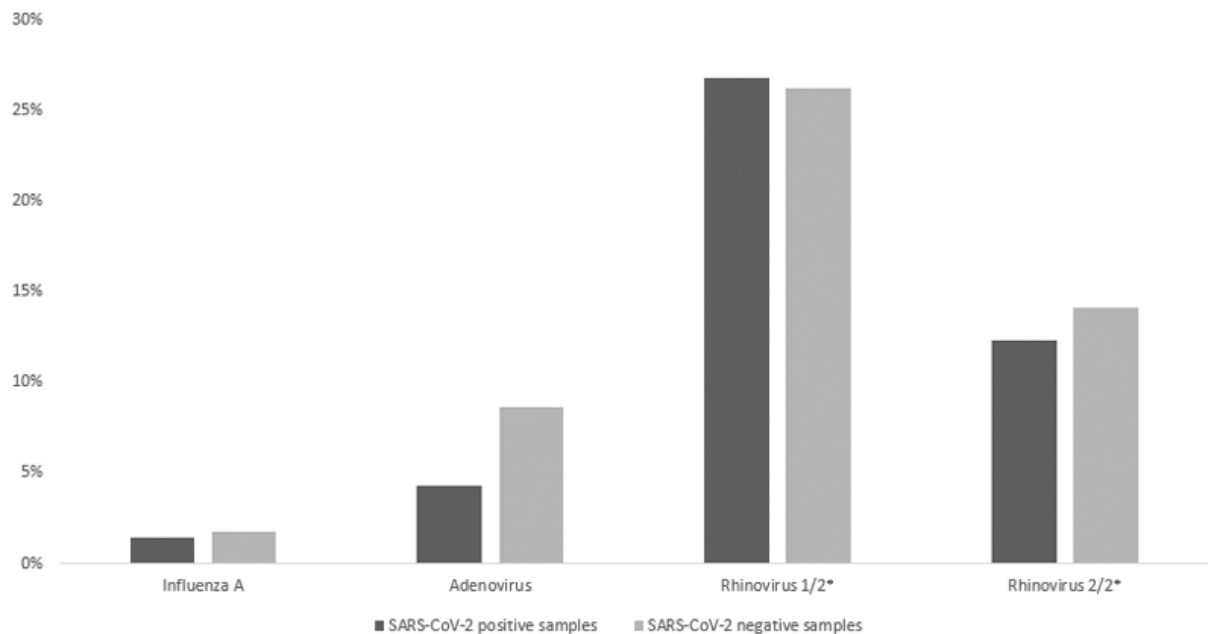


FIGURE 2: Frequencies Influenza A, Adenovirus and Rhinovirus (RV) positive samples distributed in the 418 SARS-CoV-2 positive or the 569 negative cases. *Names of the primer-probe kit according to manufacturer of the commercial kit used. Fewer samples were tested for RV.

In addition, some coinfections were also detected. SARS-CoV-2 was detected in coinfections with all the other three viruses found in this study including a triple coinfection with FLUAV and HAdV-C. Also, RV and HAdV-C were the viruses most found in coinfections with SARS-CoV-2. Viral combinations in coinfections and their frequencies can be more clearly visualized in Figure 3.

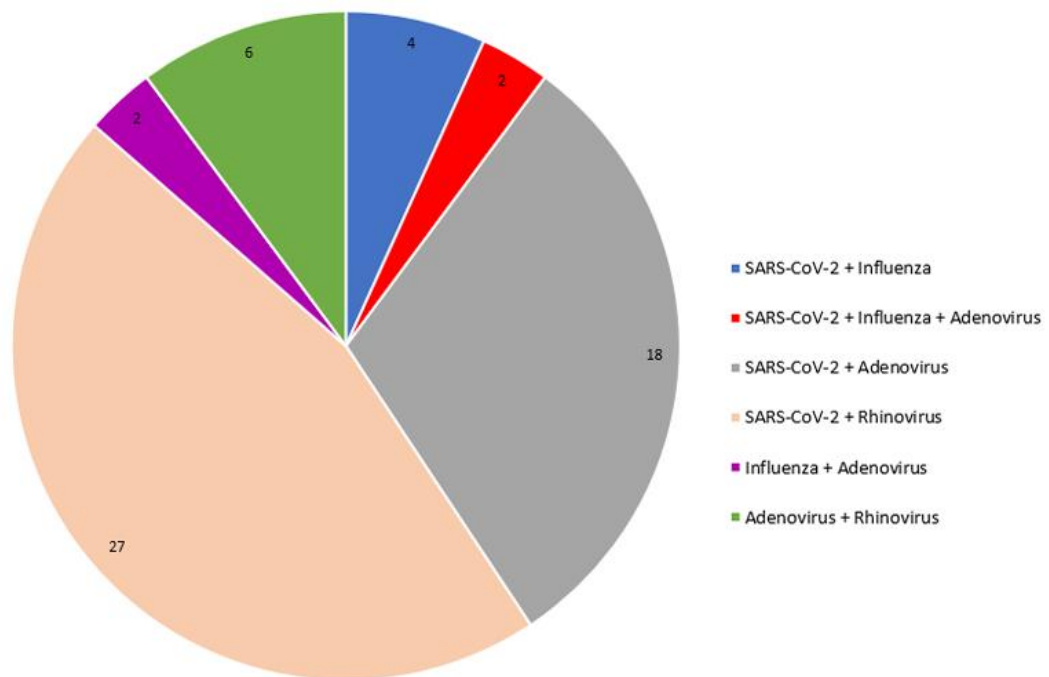


FIGURE 3: Coinfections cases between SARS-CoV-2, Influenza A (FLUAV), Adenovirus (HAdV) and Rhinovirus. Different dual coinfections were found as well as a triple coinfection with SARS-CoV-2, FLUAV and HAdV.

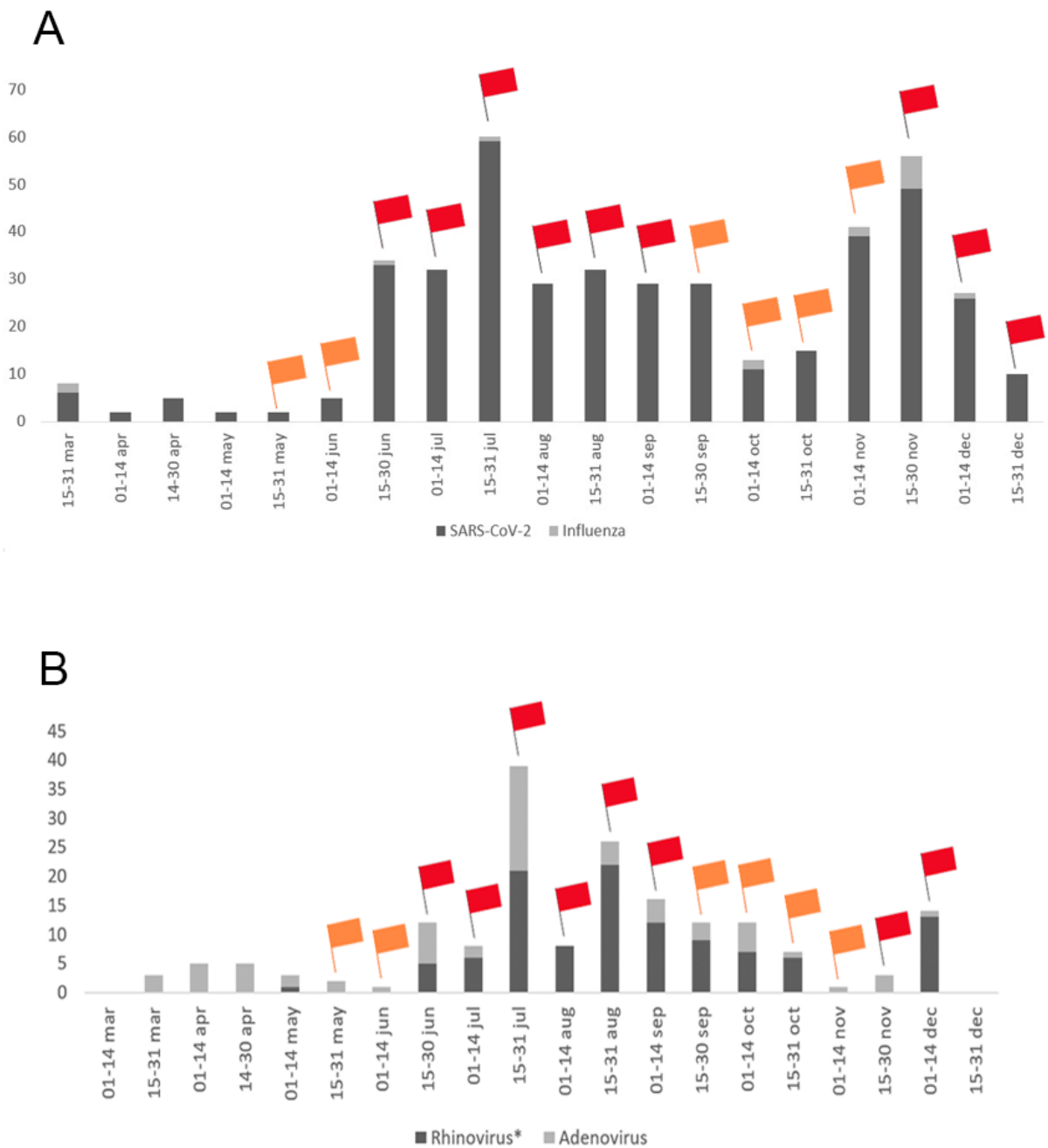


FIGURE 4: Distribution of positive cases along the year and current risk flag of the government for certain measures of social distancing. Being the red one high risk of contagion which imposes more restricted measures on businesses and establishments and the orange moderate risk, with more flexible measures. A. Distribution of 418 SARS-CoV-2 and 16 influenza A positive patients; B. Positive cases of Adenovirus and Rhinovirus (RV) along the year. *Fewer samples were tested for RV and so distribution may be biased.

4 | DISCUSSION

This past year had several unusual aspects due to the arrival of SARS-CoV-2 all around the world, Brazil's first case was in February and in March several states already had cases, including Rio Grande do Sul state where this study took place ²³. One of the peculiar aspects of COVID-19 pandemic was the preventive measures taken to avoid infection, like face masking by populations that usually did not have this habit, the isolation of people presenting respiratory symptoms, frequent hand washing and social distancing, therefore these precautions probably had an effect in other viruses besides SARS-CoV-2 ^{16,24,25}.

In this study was possible to verify a low frequency of FLUAV in hospitalized patients with cases of ARDS during COVID-19 pandemic. Only 1.62% of the samples analyzed were positive for this virus even if FLUAV is an important cause of ARDS during autumn/winter months mainly in elderly people that, in fact, compose most of the patients included in this work ^{26,27,28,29}. For comparison, in 2019, about 17.8% (5.714) of 32.048 ARDS' samples were attributed to one of FLUVs throughout Brazil ³⁰. One probable explanation for this is the vaccination status of the population which is above 90% coverage in the state ³¹. HAdV-C also presented a low frequency (6.78%) which was also described in similar works during 2020 for other respiratory viruses ³² and in the case of RV it remains present at a considerable rate (~20%) in comparison to the past years ³³, even though being higher than that find by Nowak et al ³². Notwithstanding, in this work, a smaller number of samples were analyzed for RV.

About the distribution of cases over time, in Figure 4 it is possible to evaluate that after a few weeks in the orange flag of the controlled distancing system of the state government that indicates a medium risk of contagion ^{13,14}, the positivity of SARS-CoV-2 rises. After the second and longer period with orange flags, around eight weeks, most of FLUAV positive cases of this study occurred in November accompanied by an increase also in the number of positive SARS-CoV-2 cases, probably because people may have circulated more due to the orange flag that must have passed a false sense of safety to the population.

We have detected some viral coinfections including SARS-CoV-2 as presented in Table 2. SARS-CoV-2 + HAdV-C and SARS-CoV-2 + RV coinfections occurred more often probably due to the greater frequency of these viruses in samples tested and in spite of low FLUAV frequency a dual and a triple coinfection with this virus were detected. Viral respiratory coinfections are very common and several studies already reported viral coinfections with SARS-CoV-2, including with FLUAV, although it is probably not occurring as often as it might be expected, which may be due to a lack of diagnosis for other viruses in this pandemic period ^{32,34,35,36,37,38,39}.

Still, on the topic of coinfections, there is a risk of disease exacerbation in these cases, considering that the immunologic system is already disturbed due to the first infection. In studies that reported viral coinfections with COVID-19, there is not yet clear if these cases are associated with more severe disease^{38,40,41,42}, except for the study of Yue et al.⁴³ that suggested that SARS-CoV-2 and FLUBV coinfection might be associated with more severe cases, but authors commented that this virus was circulating more than FLUAV so this finding may be biased. Another exception is the work of Li et al.⁴⁴ which reported that coinfections with COVID-19 are more associated with patients in intensive care unit, but did not separate viral of bacterial coinfections. In sum, the understanding of possible COVID-19 aggravation by coinfection with other respiratory viruses is still largely unknown, in this study, we did not aim to evaluate clinical outcomes, so this topic still needs further investigations in future studies.

5 | CONCLUSION

In the present work, FLUV was reported in a very low frequency among hospitalized patients with ARDS compared to the past years, probably due to preventive measures taken to avoid COVID-19 and the high influenza vaccination coverage in 2020. We also demonstrated a relatively normal frequency of RV. Some viral coinfections were detected, including SARS-CoV-2 and FLUAV and a triple coinfection of SARS-CoV-2, FLUAV and HAdV-C, although it is still not clear if viral coinfection is associated with a more severe disease.

6 | ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for the graduate scholarships, Financiadora de Estudos e Projetos – Finep and RedeVírus Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC for the research funding. This work is part oth the research efforts from Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP affiliated to RedeVírus/MCTI (FINEP = 01.20.0029.000462/20, CNPq = 404096/2020-4).

7 | REFERENCES

1. ICTV. Naming the 2019 Coronavirus. Published 2020. Accessed January 9, 2021. <https://talk.ictvonline.org/>
2. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
3. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
4. WHO. COVID-19 WHO Dashboard. Published 2021. Accessed January 9, 2021. <https://covid19.who.int/>
5. WHO. Archived: WHO Timeline – Covid-19. World Health Organization. Published 2020. Accessed July 30, 2020. <https://www.who.int/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
6. Feikin DR, Njenga MK, Bigogo G, et al. Etiology and incidence of viral and bacterial acute respiratory illness among older children and adults in rural western kenya, 2007-2010. *PLoS One*. 2012;7(8):2007-2010. doi:10.1371/journal.pone.0043656
7. Seo Y Bin, Song JY, Choi MJ, et al. Etiology and clinical outcomes of acute respiratory virus infection in hospitalized adults. *Infect Chemother*. 2014;46(2):67-76. doi:10.3947/ic.2014.46.2.67
8. Bezerra PGM, Britto MCA, Correia JB, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One*. 2011;6(4):4-12. doi:10.1371/journal.pone.0018928
9. Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults.pdf. *J Med Virol*. 2008;(80):1824-1827. doi:10.1002/jmv.21295
10. Gregianini TS, Varella IRS, Fisch P, Martins LG, Veiga ABG. Dual and Triple Infections with Influenza A and B Viruses: A Case-Control Study in Southern Brazil. *J Infect Dis*. 2019;220(6):961-968. doi:10.1093/infdis/jjz221
11. Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha MLT, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Potto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):283-291. doi:10.1590/s0037-86822002000400002

12. Girardi V, Gregianini TS, Gulate JS, et al. Temporal dynamics of Human mastadenovirus species in cases of respiratory illness in southern Brazil. Published online 2019.
13. GOV-RS. Modelo de Distanciamento Controlado Rio Grande do Sul. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Published 2020. Accessed January 12, 2021. <https://distanciamentocontrolado.rs.gov.br/>
14. GOV-RS. DECRETO Nº 55.241, DE 10 DE MAIO DE 2020. Estado do Rio Grande do Sul Assembléia Legislativa. Published 2020. http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXTO&Hid_TodasNormas=66394&hTexto=&Hid_IDNorma=66394
15. Leung NHL, Chu DKW, Shiu EYC, et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. *Nat Med.* 2020;26(May). doi:10.1038/s41591-020-0843-2
16. Wu D, Lu J, Liu Y, Zhang Z, Luo L. Positive effects of COVID-19 control measures on influenza prevention. *Int J Infect Dis.* 2020;(January). doi:10.1016/j.ijid.2020.04.009
17. Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination □. 2010;76(5):1388-1394. doi:10.1128/AEM.02249-09
18. CDC. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A (H1N1). 2009;1(April).
19. Selvaraju SB, Selvarangan R. Evaluation of Three Influenza A and B Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays and a New 2009 H1N1 Assay for Detection of Influenza Viruses. 2010;48(11):3870-3875. doi:10.1128/JCM.02464-09
20. Rönkkö E, Ikonen N, Kontio M, Ziegler T. Validation and Diagnostic Application of NS and HA Gene-Specific Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):2009-2011. doi:10.1128/JCM.00259-11
21. Tse H, To KKW, Wen X, et al. Clinical and Virological Factors Associated with Viremia in Pandemic Influenza A / H1N1 / 2009 Virus Infection. 2011;6(9). doi:10.1371/journal.pone.0022534
22. Corman V, Bleicker T, Brünink S, et al. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. Published online 2020.
23. Ministério da Saúde – MS. Painel Coronavírus. Published 2020. Accessed January 12, 2021. <https://covid.saude.gov.br/>

24. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Amemiya K, Nagakubo Y. Analysis of Covid-19 and non-Covid-19 viruses, including influenza viruses, to determine the influence of intensive preventive measures in Japan. *J Clin Virol.* 2020;(January). doi:10.1016/j.jcv.2020.104543
25. Chotpitayasunondh T, Kølsen T, Heraud J, et al. Influenza and COVID-19 : What does co-existence mean ? 2020;(October):1-6. doi:10.1111/irv.12824
26. Zhang D, He Z, Xu L, et al. Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China. *Int J Infect Dis.* 2014;25:159-164. doi:10.1016/j.ijid.2014.02.019
27. Yu J, Xie Z, Zhang T, et al. Comparison of the prevalence of respiratory viruses in patients with acute respiratory infections at different hospital settings in North China, 2012-2015. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1-10. doi:10.1186/s12879-018-2982-3
28. Sakamoto H, Ishikane M, Ueda P. Seasonal Influenza Activity During the SARS-CoV-2 Outbreak in Japan. *Jama.* Published online 2020:4-6. doi:10.1001/jama.2020.6173
29. Liu T, Li Z, Zhang S, et al. Viral Etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong Province , China. *Virology J.* Published online 2015:1-7. doi:10.1186/s12985-015-0388-z
30. Ministério da Saúde – MS. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019. Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico 38. Published 2019. Accessed January 12, 2021. <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-38-2-interativo.pdf>
31. Ministério da Saúde – MS. Campanha Nacional de Vacinação Contra Influenza 2020 VACINÔMETRO. SIPNI - Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações. Published 2020. Accessed January 13, 2021. <http://sipni-gestao.datasus.gov.br/si-pni-web/faces/relatorio/consolidado/vacinometroInfluenza.jsf>
32. Nowak MD, Sordillo EM, Gitman MR, Mondolfi AEP. Co-infection in SARS-CoV-2 infected Patients: Where Are Influenza Virus and Rhinovirus/Enterovirus? *J Med Virol.* Published online 2020:0-3. doi:10.1002/jmv.25953
33. Kurskaya O, Ryabichenko T, Leonova N, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in Novosibirsk City , Russia (2013 – 2017). Published online 2018:1-12.
34. Zhu X, Ge Y, Wu T, et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019

- cases. *Virus Res.* 2020;(January). doi:10.1016/j.virusres.2020.198005
35. D'Abramo A, Lepore L, Palazzolo C, et al. Acute respiratory distress syndrome due to SARS-CoV-2 and Influenza A co-infection in an Italian patient: Mini-review of the literature. *Int J Infect Dis.* 2020;(97):1201-9712. doi:10.1016/j.ijid.2020.06.056
 36. Zheng X, Wang H, Su Z, et al. Co-infection of SARS-CoV-2 and Influenza virus in Early Stage of the COVID-19 Epidemic in Wuhan, China. *J Infect.* 2020;(January):19-21. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.041
 37. Huang B-R, Lin Y-L, Wan C-K, et al. Co-infection of influenza B virus and SARS-CoV-2: A case report from Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* Published online 2020. doi:10.1016/j.jmii.2020.06.011
 38. Khodamoradi Z, Moghadami M, Lotfi M. Co-infection of coronavirus disease 2019 and influenza a: A report from Iran. *Arch Iran Med.* 2020;23(4):239-243. doi:10.34172/aim.2020.04
 39. Antony SJ, Almaghlouth NK, Heydemann EL. Are co-infections with COVID-19 and Influenza low or underreported? An observational study examining current published literature including three new unpublished cases. *J Med Virol.* Published online 2020:0-1. doi:10.1002/jmv.26167
 40. Kondo Y, Miyazaki S, Yamashita R, Ikeda T. Coinfection of SARS-CoV-2 and Influenza A virus. *BMJ.* 2020;13(e236812):2-4. doi:10.1136/bcr-2020-236812
 41. Cuadrado-Payán E, Montagud-Marrahi E, Torres-Elorza M, et al. SARS-CoV-2 and influenza virus co-infection. *Lancet.* Published online 2020. doi:10.1016/S0140-6736(20)31052-7
 42. Konala VM, Adapa S, Gayam V, Naramala S, Daggubati SR. Co-infection with Influenza A and COVID-19. Published online 2020:2018-2021. doi:10.12890/2020
 43. Yue H, Zhang M, Xing L, et al. The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients during COVID-19 outbreak. *J Med Virol.* Published online 2020:0-2. doi:10.1002/jmv.26163
 44. Li Z, Chen Z, Chen L-D, et al. Coinfection with SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens in patients with COVID-19 in Guangzhou, China. *J Med Virol.* Published online 2020:1-3. doi:10.1002/jmv.26073

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho 987 amostras de pacientes hospitalizados com SRAG foram analisadas para avaliar a frequência de FLUAV, FLUBV e HAdV-C e um menor número para RV, onde constatou-se uma baixa circulação de FLUAV e HAdV-C e uma circulação semelhante a anos anteriores para RV, apesar do menor número amostral. Apesar disso, algumas coinfeções foram detectadas como SARS-CoV-2 e FLUAV, SARS-CoV-2 e HAdV-C, SARS-CoV-2 e RV, FLUAV e HAdV-C e HAdV-C e RV, além de uma tripla coinfeção entre SARS-CoV-2, FLUAV e HAdV-C. O papel destas coinfeções quanto aos desfechos clínicos ainda precisa ser melhor esclarecido em estudos futuros.

Estes achados apontam que a circulação de FLUV foi menor em casos de SRAG em relação a anos anteriores, tendo sido a alta aderência na vacinação de gripe, o uso de máscaras pela população e os outros cuidados preventivos para COVID-19 provavelmente os principais responsáveis por diminuir a infecção e transmissão deste vírus assim como dos demais vírus respiratórios. Além disso, os resultados apresentados neste trabalho também indicaram a influência das medidas de distanciamento adotadas pelo governo no número de casos positivos para SARS-CoV-2 e FLUV nas semanas subsequentes.

5 REFERÊNCIAS

ACHESON, Nicholas H.; WILEY, John. **Fundamentals of Molecular Virology**. 2. ed. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.wiley>.

BASNET, Sarmila; PALMENBERG, Ann C.; GERN, James E. Rhinoviruses and Their Receptors. **CHEST**, [S. l.], v. 155, n. 5, p. 1018–1025, 2019. DOI: 10.1016/j.chest.2018.12.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>.

BELLEI, Nancy; CARRARO, Emerson; PEROSA, Ana; WATANABE, Aripuana; ARRUDA, Eurico; GRANATO, Celso. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults.pdf. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], n. 80, p. 1824–1827, 2008. DOI: 10.1002/jmv.21295.

BEZERRA, Patrícia G. M.; BRITTO, Murilo C. A.; CORREIA, Jailson B.; DUARTE, Maria do Carmo M. B.; FONCECA, Angela M.; ROSE, Katie; HOPKINS, Mark J.; CUEVAS, Luis E.; MCNAMARA, Paul S. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 4–12, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0018928.

DRYSDALE, Simon B.; MEJIAS, Asuncion; RAMILO, Octavio. Rhinovirus – not just the common cold. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 74, p. S41–S46, 2017. DOI: 10.1016/S0163-4453(17)30190-1. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30190-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30190-1).

DUNNING, Jake; THWAITES, Ryan S.; OPENSHAW, Peter J. M. Seasonal and pandemic influenza: 100 years of progress, still much to learn. **Mucosal Immunology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 566–573, 2020. DOI: 10.1038/s41385-020-0287-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41385-020-0287-5>.

GIRARDI, Viviane; GREGIANINI, Tatiana Schäffer; GULARTE, Juliana Schons; DEMOLINER, Meriane; SEADI, Claudete Farina; STRALIOTTO, Selir Maria; MARTINS, Letícia Garay; SPILKI, Fernando Rosado. Temporal dynamics of Human mastadenovirus species in cases of respiratory illness in southern Brazil. [S. l.], 2019.

GREENBERG, Stephen B. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. [S. l.], 2016.

HAAKE, Christine; COOK, Sarah; PUSTERLA, Nicola; MURPHY, Brian. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–22, 2020. DOI: 10.3390/v12091023.

ICTV. **ICTV 9th Report (2011) Coronaviridae**. 2011a. Disponível em:

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae. Acesso em: 29 jul. 2020.

ICTV. **ICTV 9th Report (2011) Orthomyxoviridae**. 2011b. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae. Acesso em: 23 jul. 2020.

ICTV. **ICTV 9th Report (2011) Adenoviridae**. 2011c. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/93/adenoviridae.

ICTV. **Naming the 2019 Coronavirus**. 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acesso em: 9 jan. 2021.

III, Joseph P. Lynch; KAJON, Adriana E. Adenovirus : Epidemiology , Global Spread of Novel Serotypes , and Advances in Treatment and Prevention. *[S. l.]*, p. 586–602, 2016.

JOSEPH, Udayan; SU, Yvonne C. F.; VIJAYKRISHNA, Dhanasekaran; SMITH, Gavin J. D. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. **Influenza and other Respiratory Viruses**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, p. 74–84, 2017. DOI: 10.1111/irv.12412.

KUMLIM, Urban; OLOFSSON, Sigvard; DIMOCK, Ken; ARNBERG, Niklas. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism.pdf. **Influenza and other Respiratory Viruses**, *[S. l.]*, n. 2, p. 147–154, 2008. DOI: 10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x.

MICHEL, Christian Jean; MAYER, Claudine; POCH, Olivier; THOMPSON, Julie Dawn. Characterization of accessory genes in coronavirus genomes. **Virology Journal**, *[S. l.]*, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1186/s12985-020-01402-1.

MORRIS, Gerwyn; BORTOLASCI, Chiara C.; PURI, Basant K.; OLIVE, Lisa; MARX, Wolfgang. The pathophysiology of SARS-CoV-2 : A suggested model and therapeutic approach. *[S. l.]*, n. January, 2020.

Ministério da Saúde – MS. **Boletim Epidemiológico Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 29 de 2013**. [s.l: s.n.].

Ministério da Saúde – MS. **Informe Epidemiológico Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2018**. [s.l: s.n.].

Ministério da Saúde – MS. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019**. 2019. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-38-2-interativo.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.

Ministério da Saúde – MS. **Definição de Caso e Notificação**. 2021. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/definicao-de-caso-e-notificacao>. Acesso em: 14 jan. 2021.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro.

RANIERI, V. Marco; RUBENFELD, Gordon D.; THOMPSON, B. Taylor; FERGUSON, Niall D.; CALDWELL, Ellen; FAN, Eddy; CAMPOROTA, Luigi; SLUTSKY, Arthur S. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 2012. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.

SEO, Yu Bin; SONG, Joon Young; CHOI, Min Ju; KIM, In Seon; YANG, Tea Un; HONG, Kyung Wook; CHEONG, Hee Jin; KIM, Woo Joo. Etiology and clinical outcomes of acute respiratory virus infection in hospitalized adults. **Infection and Chemotherapy**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 67–76, 2014. DOI: 10.3947/ic.2014.46.2.67.

Secretaria Estadual de Saúde do Governo do Rio Grande do Sul – SES-RS. **Painel Coronavírus RS**. 2021. Disponível em: <https://ti.saude.rs.gov.br/covid19/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SHORT, Kirsty R.; KROEZE, Edwin J. B. Veldhui.; FOUCHIER, Ron A. M.; KUIKEN, Thijs. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 57–69, 2014. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70286-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70286-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70286-X).

SONG, Peipei; LI, Wei; XIE, Jianqin; HOU, Yanlong; YOU, Chongge. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. [S. l.], n. January, 2020.

STRALIOTTO, Selir Maria; SIQUEIRA, Marilda M.; MULLER, Rafael L.; FISCHER, Gilberto B.; CUNHA, Mara L. T.; NESTOR, Sandra M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Potto Alegre, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 283–291, 2002. DOI: 10.1590/s0037-86822002000400002.

TAUBENBERGER, Jeffery K.; MORENS, David M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 15–22, 2006. DOI: 10.3201/eid1209.05-0979.

TO, Kelvin K. W.; YIP, Cyril C. Y.; YUEN, Kwok-yung. Rhinovirus e From bench to bedside. **Journal of the Formosan Medical Association**, [S. l.], v. 116, n. 7, p. 496–504, 2017. DOI: 10.1016/j.jfma.2017.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2017.04.009>.

TONG, Suxiang et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 109, n. 11, p. 4269-4274, 2012.

TONG, Suxiang et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003657, 2013.

WHO. **Archived: WHO Timeline - Covid-19**. 2020a. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline---covid-19>. Acesso em: 9 jan. 2021.

WHO. **Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. 2020b. Disponível em:

<https://covid19.who.int/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

WHO. **Archived: WHO Timeline – Covid-19**. 2020c. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline---covid-19>. Acesso em: 30 jul. 2020.

WILLE, Michelle; HOLMES, Edward C. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- And deltacoronaviruses. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 631–644, 2020. DOI: 10.1093/femsre/fuaa026.

WOLFRUM, Nina; GREBER, Urs F. Microreview Adenovirus signalling in entry. [S. l.], v. 15, n. November 2012, p. 53–62, 2013. DOI: 10.1111/cmi.12053.

ZELL, R. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile : Picornaviridae. [S. l.], p. 2421–2422, 2017. DOI: 10.1099/jgv.0.000911.