

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Núcleo de Medicina Tropical

Fábio Gonçalves da Silva

**Uso da metagenômica viral na avaliação de pacientes transplantados
renais**

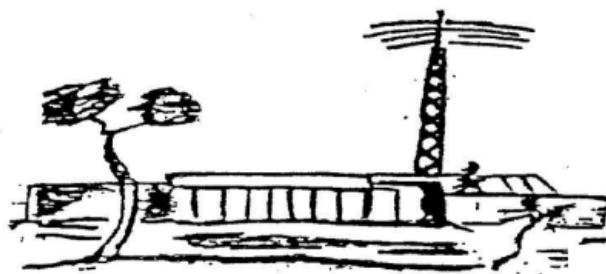
Brasília, 2025

FÁBIO GONÇALVES DA SILVA

USO DA METAGENÔMICA VIRAL NA AVALIAÇÃO DE PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. Área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad



BRASÍLIA - DF

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dS586u	da Silva, Fábio Gonçalves Uso da metagenômica viral na avaliação de pacientes transplantados renais / Fábio Gonçalves da Silva; orientador Rodrigo Haddad. Brasília, 2025. 107 p. Tese(Doutorado em Medicina Tropical) Universidade de Brasília, 2025. 1. Transplante renal. 2. Metagenômica. 3. EBV. 4. CMV. 5. HPgV-1. I. Haddad, Rodrigo, orient. II. Título.
--------	---

Tese aprovada em: 31/10/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Haddad (Presidente)

Dr. Svetoslav Nanev Slavov (Membro externo)

Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci (Membro externo)

Prof. Dr. Alex Leite Pereira (Membro interno)

Prof. Dr. Edgar Guimarães Bione (Membro Suplente)

A meu pai, Waldir Pereira da Silva (*in memoriam*)

*“E mesmo sem te ver
Acho até que estou indo bem
Só apareço, por assim dizer
Quando convém aparece.*

[...]

*Quero que saibas que me lembro
Queria até que pudesses me ver
És parte ainda do que me faz forte*

[...]

Mas tudo bem, tudo bem, tudo bem...”

Legião Urbana - Giz

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

À Universidade de Brasília, ao Núcleo de Medicina Tropical e a todos os seus docentes pela oportunidade que me foi dada. Agradeço sinceramente ao professor Dr. Rodrigo Haddad por toda confiança depositada, paciência e ensinamentos.

Aos capacitados profissionais técnicos dos laboratórios do Campus de Ceilândia que me auxiliaram ao longo do caminho, em especial Lorena e Elias.

A meus pais que fizeram de mim tudo aquilo que sou hoje. Não há como agradecer por tudo que são em minha vida. Aos meus familiares e a Ruana, minha esposa, pelo apoio e compreensão.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo e torceram por este trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Categorias de taxa de filtração glomerular na DRC

Tabela 2: Categorias de albuminúria na DRC

Tabela 3: Prognóstico para o desenvolvimento de DRC conforme a TFG e a classificação de albuminúria

Tabela 4: Tabela 4. Distribuição por sexo e idade média dos participantes do estudo

Tabela 5: Distribuição dos participantes segundo raça/cor autodeclarada e sexo.

Tabela 6: Distribuição dos participantes segundo o tempo pós-transplante no momento da coleta da amostra.

Tabela 7: População estudada e prevalência de RNA do HPgV-1.

Tabela 8. Prevalência de RNA do HPgV-1 segundo faixa etária e tempo pós-transplante

Tabela 9. População estudada e prevalência de DNA de CMV e BKV.

Tabela 10. Prevalência de DNA de CMV por grupos etários e tempo após transplante renal

Tabela 11. População estudada e prevalência de DNA de BKV.

Tabela 12. Prevalência de DNA de BKV por grupos etários e tempo após transplante renal

Tabela 13. População estudada e prevalência de DNA do EBV

Tabela 14. Prevalência de DNA do EBV segundo faixa etária e tempo pós-transplante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama do CMV

Figura 2: Diagrama do vírus *Varicella zoster*

Figura 3: Esquema do DNA de um poliomavirus humano com tropismo ao receptor SV-40

Figura 4: Poliproteína genômica do Pegvirus

Figura 5: Análise do sequenciamento de nova geração (metagenômica viral)

Figura 6. Árvore filogenética dos HPgV-1

LISTA DE ABREVIACES

BKV: BK virus

CMV: Citomegalovírus

CNI: Inibidores da calcineurina

DMC: doadores com morte circulatória

DME: doadores com morte encefálica

DNA: *deoxyribonucleic acid*

DRC: doença renal crônica

EBV: *Epstein-Barr virus*

ERL: everolimus

ATG: Globulina anti-timcito

HHV-3: *Human Herpes virus 3*

HHV-6: *Human Herpes virus 6*

HIV: *Human Immunodeficiency virus*

HPgV: *Human Pegvirus*

HTLV: *Human T-lymphotropic virus*

ISGs: Genes estimulados por Interferon

KDIGO: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

LMP1: Proteína de membrana latente 1

LMP2: Proteína de membrana latente 2

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

NABKV: Nefropatia associada ao BK vrus

NGS: *new generation sequencing*

Ps-TxR: ps-transplante renal

PTLD: Doença Linfoproliferativa Ps-Transplante

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

RNA: *ribonucleic acid*

RT-PCR: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

RTRs: Receptores de transplante renal

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

SIR: sirolimus

TTV: *Torque Teno virus*

VZV: *Varicella zoster virus*

ÍNDICE

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença renal crônica.....	14
1.2 Transplante renal	17
1.3. Desafios após o transplante.....	20
1.3.1. Terapia imunossupressora	20
1.3.2. Doenças infecciosas	21
1.4. Os vírus e o transplante renal	23
1.4.1. Citomegalovírus	23
1.4.2. Vírus <i>Varicela-Zoster</i>	25
1.4.3. Vírus BK	27
1.4.4. Pegvirus humano.....	29
1.5 O diagnóstico das infecções virais	31
1.5.1. As bases do diagnóstico	31
1.5.2. Tecnologia de sequenciamento de nova geração.....	32
1.5.3. O sequenciamento de nova geração e a pesquisa no campo da metagenômica	33
1.5.4. O viroma humano	35
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
4. MÉTODOS.....	41
4.1. Pacientes e coleta de amostras.....	41
4.2. Preparação de amostras e sequenciamento Illumina.....	41
4.3. Análise de bioinformática	42
4.4. Confirmação dos resultados	43
4.4.1. Extração do RNA viral de HPgV-1 e detecção por RT-qPCR	44
4.4.2. Amplificação da região 5'-UTR do HPgV-1 por RT-PCR Nested.....	44
4.4.3. Análise filogenética do HPgV-1	45
4.4.4. Confirmação de BKV por qPCR.....	46
4.4.5. Confirmação de CMV por qPCR	46
4.4.6. Confirmação de EBV e HHV-6 por qPCR.....	47
4.4.7. PCR em tempo real para detecção de VZV	47

4.4.8. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Caracterização da população estudada	48
5.2. Metagenômica viral	49
5.3. Prevalência e caracterização genotípica do Pegivírus humano tipo 1.....	51
5.4. Prevalência de CMV em Receptores de Transplante Renal	55
5.5. Prevalência de BKV em Receptores de Transplante Renal	57
5.6. Prevalência de EBV em Receptores de Transplante Renal	59
5.7. Ausência de Detecção de HHV-6 em Receptores de Transplante Renal	61
5.8. Ausência de Detecção de VZV em Receptores de Transplante Renal	62
5.9. Síntese dos achados por NGS e qPCR	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS	108

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se como uma condição clínica progressiva e irreversível que compromete definitivamente a função e a estrutura renal, incapacitando os rins de realizarem adequadamente a filtração sanguínea. Esta condição frequentemente desencadeia comorbidades com elevado potencial letal, principalmente de origem cardiovascular. Para pacientes que evoluem para estágio terminal com falência renal, o transplante representa a única alternativa terapêutica definitiva. Os receptores de transplante renal iniciam a terapia imunossupressora antes do procedimento cirúrgico. Após o implante do enxerto, preconiza-se a terapia de indução com agentes biológicos, especialmente durante os primeiros meses pós-transplante, visando prevenir episódios de rejeição aguda. Um desafio significativo no acompanhamento clínico destes pacientes é o surgimento de infecções oportunistas e reativações virais, consequência direta do estado de imunossupressão terapêutica. Considerando a escassez de estudos voltados para o estudo do viroma sanguíneo de pacientes transplantados renais no Brasil, este estudo propôs investigar o perfil viral circulante nesta população específica. Foram avaliados, por metagenômica, o viroma no plasma de 100 receptores de transplante renal (58 homens e 42 mulheres) atendidos no Hospital Universitário de Brasília (Distrito Federal, Brasil). Após validação com qPCR, os resultados demonstraram prevalências relativas de 18,8% para Citomegalovírus (CMV), 20% para Pegvírus humano do tipo 1 (HPgV-1), a frequência média estimada foi de 3,15%, para vírus Epstein-Barr (EBV) e 3,8% para BK vírus. Para os HPgV, a análise filogenética realizada demonstrou a presença dos genótipos 1, 2 e 3. O genótipo predominante foi o 2 (78,9%), que se apresentou com dois subgenótipos distintos: 2A (5,3%), e 2B (73,6%). Interessantemente, genótipos do HPgV-1 relatados com menor frequência no Brasil também foram identificados, para o genótipo 1 (10,5%) e para o genótipo 3 (10,5%).

PALAVRAS-CHAVE: transplante renal, metagenômica, EBV, CMV, HPgV-1.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is characterized as a progressive and irreversible clinical condition that definitively compromises renal function and structure, rendering the kidneys unable to adequately perform blood filtration. This condition frequently triggers comorbidities with high lethal potential, mainly of cardiovascular origin. For patients who progress to end-stage renal failure, transplantation represents the only definitive therapeutic alternative. Renal transplant recipients begin immunosuppressive therapy before the surgical procedure. After graft implantation, induction therapy with biological agents is recommended, especially during the first months post-transplant, aiming to prevent episodes of acute rejection. A significant challenge in the clinical follow-up of these patients is the emergence of opportunistic infections and viral reactivations, a direct consequence of the therapeutic immunosuppression state. Considering the number of studies focused on investigating the blood virome of renal transplant patients in Brazil, this study proposed to investigate the circulating viral profile in this specific population. A total of 100 renal transplant recipients (58 men and 42 women) treated at the University Hospital of Brasília (Federal District, Brazil) were randomly selected for analysis of their viromes. The results demonstrated relative prevalences of 18,8% for Cytomegalovirus (CMV), 20% for HPgV-1, with an estimated average frequency of 3,15% for Epstein-Barr virus (EBV) and 3,8% for BKV. For HPgV-1, the phylogenetic analysis performed demonstrated the presence of genotypes 1, 2, and 3. The predominant genotype was 2 (78.9%), which presented with two distinct subgenotypes: 2A (5.3%), and 2B (73.6%). Interestingly, HPgV-1 genotypes reported less frequently in Brazil were also identified, for genotype 1 (10.5%) and for genotype 3 (10.5%).

KEYWORDS: kidney transplantation, metagenomics, EBV, CMV, HPgV-1.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se como uma condição patológica progressiva e irreversível que compromete definitivamente a função e a estrutura renal, incapacitando os rins de realizarem adequadamente a filtração plasmática, além de potencialmente desencadear comorbidades com elevado potencial letal, predominantemente de origem cardiovascular.¹ Esta característica elevou a DRC ao *status* de uma das principais causas de mortalidade nos últimos anos. Dados epidemiológicos estimam que aproximadamente 843,6 milhões de indivíduos sejam acometidos pela DRC em escala global, representando mais de 10% da população mundial.²

A fisiopatologia da DRC promove um conjunto de manifestações clínicas e laboratoriais, incluindo anemia, maior vulnerabilidade a processos infecciosos, distúrbios hidroeletrólíticos (com destaque para as alterações nos níveis séricos de fósforo, cálcio e potássio), hiporexia e perda ponderal, além de impactar negativamente e de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes acometidos.³

Caracteristicamente, a DRC apresenta-se como uma patologia de evolução silenciosa, manifestando sintomatologia evidente apenas em seus estágios mais avançados. O diagnóstico fundamenta-se na avaliação clínica integrada a parâmetros laboratoriais, com ênfase na determinação sérica de creatinina, cistatina C, albumina, ureia, potássio e na mensuração da taxa de depuração da creatinina.^{1,3}

De acordo com os critérios estabelecidos pela organização internacional *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), a DRC pode ser estratificada em quatro estágios distintos de comprometimento funcional renal, conforme a taxa de filtração glomerular (TABELA 1), ou alternativamente em três categorias quando se considera a relação entre albumina urinária e níveis de creatinina (TABELA 2).⁴

TABELA 1 | Categorias de taxa de filtração glomerular na DRC

Categoria TFG	TFG (ml/min/1.73 m ²)	Termos
G1	≥90	Normal ou Alta
G2	60-89	Fracamente diminuída*
G3a	45-59	Fracamente ou moderadamente diminuída
G3b	30-44	Moderada a severamente diminuída
G4	15-29	Severamente diminuída
G5	<15	Falência renal

*Relativa aos níveis de um adulto jovem com comprovada ausência de lesão renal.

Referência: KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. Kidney Int Suppl. 2024;105(45):S117-S314

TABELA 2 | Categorias de albuminúria na DRC

Razão albumina/creatinina (RAC) (equivalente aproximado)				
Categoria	Taxa de excreção de albumina (mg/24 hours)	(mg/mmol)	(mg/g)	Termos
A1	<30	<3	<30	Normal a fracamente aumentada
A2	30-300	3-30	30-300	Moderadamente aumentada
A3	>300	>30	>300	Severamente aumentada

Referência: KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. Kidney Int Suppl. 2024;105(45):S117-S314

Conforme a classificação do paciente nessas categorias, o KDIGO desenvolveu um preditor prognóstico para DRC (TABELA 3).²

TABELA 3 | Prognóstico para o desenvolvimento de DRC conforme a TFG e a classificação de albuminúria

				Categorias de albuminúria persistente		
				A1	A2	A3
				Normal a fracamente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
				<30 mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
Categorias de TFG (ml/min/1.73 m ²)	G1	Normal ou alta	≥90	Baixo risco	Risco moderado	Alto risco
	G2	Fracamente diminuída	60-89	Baixo risco	Risco moderado	Alto risco
	G3a	Fracamente ou moderadamente diminuída	45-59	Risco moderado	Alto risco	Risco muito alto
	G3b	Moderada a severamente diminuída	30-44	Alto risco	Risco muito alto	Risco muito alto
	G4	Severamente diminuída	15-29	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto
	G5	Falência renal	<15	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto

Tabela adaptada de KDIGO. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. Kidney Int Suppl. 2024;105(45):S117-S314

Esta estratificação tabular constitui um instrumento preditivo valioso para estimar o risco de progressão da disfunção renal, embora a avaliação clínica integral da DRC requer a consideração de múltiplos fatores de risco que influenciam sua evolução. Destacam-se como elementos determinantes: i) comorbidades crônicas pré-existent, particularmente diabetes mellitus e afecções cardiovasculares; ii) infecções virais crônicas como HIV, HTLV, Hepatite B e C, cujos impactos na função renal são bem documentados; iii) patologias do trato urinário, incluindo infecções recorrentes e nefrolitíase; iv) doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico; v) características intrínsecas do paciente como obesidade, componentes étnico-raciais, sexo, idade e hábitos deletérios como tabagismo; e vi) histórico familiar de nefropatias crônicas.^{4,5}

O estadiamento preciso da DRC possui relevância clínica fundamental, considerando que as intervenções terapêuticas implementadas objetivam primordialmente retardar a progressão da doença. Consequentemente, a identificação de indivíduos assintomáticos, majoritariamente nos estágios iniciais da doença, assume importância crítica. A evolução caracteristicamente lenta da DRC permite o ajuste farmacológico e comportamental adequado e, em casos de insuficiência renal avançada, viabiliza o planejamento apropriado para o transplante renal.^{4,5}

O manejo clínico dos pacientes com DRC focaliza-se no tratamento das complicações secundárias à disfunção renal. Elementos fundamentais incluem o monitoramento nutricional rigoroso, o controle glicêmico adequado e a manutenção de níveis pressóricos dentro dos parâmetros de normalidade. Para pacientes diabéticos, o arsenal terapêutico frequentemente inclui estatinas, agentes antiplaquetários, inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores dos receptores de angiotensina II. Adicionalmente, a otimização da competência imunológica para prevenção de infecções oportunistas (particularmente virais), a implementação de hemodiálise em pacientes com dano renal grave e prognóstico desfavorável, e o preparo sistemático para o transplante renal em casos de falência

funcional irreversível constituem abordagens padrão no acompanhamento destes pacientes.^{4,5}

1.2 Transplante renal

Com a progressão da doença renal crônica para estágios terminais, o transplante renal torna-se a alternativa terapêutica definitiva. A história desta modalidade terapêutica remonta a 1939, quando o cirurgião ucraniano Yuri Voronyi realizou o primeiro transplante renal documentado na literatura médica. Neste procedimento pioneiro, o enxerto foi proveniente de doador falecido, e o receptor evoluiu para óbito alguns dias após a intervenção cirúrgica.⁶

Um marco significativo ocorreu em 1952, quando Jean Hamburger executou o primeiro transplante renal intervivos, no qual o enxerto materno foi implantado em um adolescente de 16 anos. Posteriormente, em 1954, Joseph Murray realizou o primeiro transplante renal com sobrevida prolongada, entre gêmeos monozigóticos idênticos, com preservação funcional do enxerto por oito anos. A era moderna da transplantação renal foi inaugurada em 1962, com os primeiros transplantes renais homólogos bem-sucedidos utilizando imunoterapia específica para prevenir eventos de rejeição aguda.^{6,7}

Apesar dos avanços científicos e técnicos significativos, o manejo clínico de receptores de transplante renal permanece um desafio médico complexo. A evolução das técnicas cirúrgicas e dos protocolos de imunossupressão proporcionou aumento expressivo na sobrevida dos pacientes transplantados. Paradoxalmente, observa-se ampliação do contingente de pacientes elegíveis para o procedimento, contrastando com a redução na disponibilidade de órgãos para doação. Adicionalmente, o manejo pré-transplante adequado, a otimização dos regimes imunossupressores e o controle de complicações infecciosas nesta população específica representam desafios contemporâneos.^{6,7}

Sob perspectiva técnica, os transplantes renais podem ser categorizados em dois grupos principais conforme a origem do órgão doado:

i) transplantes realizados com enxertos provenientes de doadores falecidos e
ii) transplantes com órgãos de doadores vivos. O procedimento com doador vivo é predominantemente realizado entre indivíduos geneticamente relacionados, embora também possa ser implementado entre indivíduos sem parentesco biológico.^{8,9}

As doações provenientes de doadores falecidos subdividem-se em: doadores com morte encefálica (DME) e doadores com morte circulatória (DMC). Os transplantes realizados com enxertos de DME apresentam vantagem significativa pela manutenção da perfusão sanguínea no órgão até o momento da captação, garantindo viabilidade tecidual superior e maior janela temporal para programação do procedimento. Nestas circunstâncias, frequentemente doador e receptor são submetidos a procedimentos cirúrgicos em salas operatórias adjacentes, proporcionando resultados clínicos comparáveis àqueles obtidos com doadores vivos.^{10, 11}

Em contraposição, o transplante com enxertos provenientes de DMC exige execução célere após a constatação do óbito do doador. Esta condição reduz a flexibilidade na programação cirúrgica, e adicionalmente, o órgão captado necessita submissão imediata a soluções de preservação e anticoagulantes. Tais particularidades podem elevar o risco de intercorrências, comprometendo potencialmente a qualidade do procedimento e a viabilidade do enxerto.^{10, 11} Em ambas as modalidades, a captação de órgãos deve observar rigorosos parâmetros éticos, diversas implicações culturais, éticas e morais podem constituir obstáculos à sua implementação em determinados contextos socioculturais.^{10, 11, 12}

A realização do transplante renal requer um rigoroso protocolo de preparação e acompanhamento, visando assegurar que o receptor apresente condições clínicas satisfatórias para suportar o procedimento cirúrgico e o subsequente regime imunossupressor.^{8,9}

Durante a avaliação pré-transplante, é imperativo descartar condições que constituam contraindicações absolutas ao procedimento. Entre estas, destacam-se: neoplasias malignas ativas, processos infecciosos não controlados como infecção pelo HIV em estágio avançado, transtornos

psiquiátricos graves refratários ao tratamento, uso compulsivo de substâncias psicoativas e demais comorbidades em estágio terminal.^{8,9} Determinados fatores clínicos demandam análise individualizada para determinar a viabilidade do transplante, incluindo obesidade mórbida, tabagismo persistente, doença arterial coronariana sintomática, hepatopatia crônica avançada, senilidade e outras condições específicas.^{8,9}

Pacientes que apresentam taxa de filtração glomerular igual ou inferior a 20mL/min/1,73m² são formalmente elegíveis para inclusão em lista de espera para transplante. Entretanto, a inscrição pode ser antecipada mediante avaliação médica criteriosa, mesmo antes que a função renal atinja esse limiar crítico. O tempo médio de permanência em lista de espera por órgão compatível oscila entre 5 e 6 anos, com variações determinadas por fatores como localização geográfica e grupo sanguíneo do receptor.^{8,9}

Na técnica cirúrgica padrão, o enxerto renal é implantado na fossa ilíaca, na região inferior do abdome, preservando-se os rins nativos do receptor, exceto em situações clínicas específicas que exijam nefrectomia bilateral. Múltiplos fatores influenciam a sobrevida do enxerto e do paciente transplantado. Receptores de enxertos provenientes de doadores vivos geralmente apresentam expectativa de sobrevida superior em comparação àqueles que recebem órgãos de doadores falecidos. Pacientes que são submetidos ao transplante preemptivo, sem terapia dialítica prévia, frequentemente exibem evolução mais favorável. A compatibilidade no sistema ABO e de histocompatibilidade do sistema HLA representam preditores significativos de prognóstico favorável, embora protocolos contemporâneos de dessensibilização e imunossupressão específica viabilizem transplantes bem-sucedidos mesmo na presença de incompatibilidades nesses sistemas.^{8, 9, 13, 14,15}

A vigilância clínica e laboratorial contínua, associada à adesão rigorosa ao regime imunossupressor, constitui elemento fundamental para a preservação funcional do enxerto a longo prazo e para a minimização de complicações potenciais, particularmente eventos infecciosos oportunistas e neoplasias secundárias.

1.3. Desafios após o transplante

1.3.1. Terapia imunossupressora

O acompanhamento pós-transplante renal demanda uma abordagem multidisciplinar centrada na educação e conscientização do paciente sobre sua nova condição clínica, capacitando-o a identificar alterações relevantes em seu estado de saúde e promovendo a adaptação adequada de seus hábitos e rotina. O seguimento clínico sistemático constitui elemento fundamental para otimização do regime farmacológico, monitoramento funcional do enxerto e manutenção do estado geral satisfatório do receptor.^{9, 16}

Os receptores de transplante renal iniciam o protocolo de imunossupressão previamente ao procedimento cirúrgico. Após o implante do enxerto, preconiza-se a adoção da terapia de indução com agentes biológicos, particularmente durante o período crítico inicial (primeiros meses pós-transplante), visando minimizar o risco de rejeição aguda.^{9, 16} O tacrolimus, um inibidor de calcineurina, representa o imunossupressor de primeira escolha na maioria dos protocolos contemporâneos, frequentemente associado a outros agentes farmacológicos conforme particularidades clínicas individuais. O monitoramento farmacocinético periódico dos imunossupressores é mandatório, com ajustes posológicos orientados por parâmetros clínico-laboratoriais, especialmente na vigência de alterações na função do enxerto.^{9, 16}

A avaliação funcional do enxerto renal deve ser realizada em intervalos regulares, mediante determinação de marcadores laboratoriais específicos. A quantificação da proteinúria, dosagem de creatinina sérica e urinária, cálculo da taxa de filtração glomerular estimada, avaliação do volume urinário e realização de ultrassonografia do enxerto na presença de sinais sugestivos de disfunção constituem ferramentas diagnósticas essenciais. Em casos selecionados com suspeita de rejeição ou disfunção de etiologia

indeterminada, a biópsia do enxerto representa o padrão-ouro diagnóstico.^{9,}

16

Este conjunto de medidas possibilita a detecção precoce de complicações e orienta intervenções terapêuticas oportunas, visando a preservação funcional do enxerto e a otimização dos desfechos clínicos. Adicionalmente, a vigilância sistemática para identificação de processos infecciosos oportunistas, particularmente reativações virais em contexto de imunossupressão, representa componente fundamental do protocolo de acompanhamento, considerando o risco aumentado de morbidade e mortalidade associado a estas complicações.^{9,16}

A implementação coordenada destes elementos de cuidado fundamenta o manejo adequado do paciente transplantado renal, permitindo intervenções apropriadas diante de respostas subótimas do enxerto e orientando condutas terapêuticas que visam reverter ou retardar desfechos desfavoráveis.^{9, 16}

1.3.2. Doenças infecciosas

Um dos maiores desafios no manejo pós-transplante renal é o equilíbrio delicado entre imunossupressão adequada para preservação do enxerto e o risco aumentado de infecções oportunistas e reativações virais. Embora a resposta satisfatória à terapia imunossupressora constitua objetivo primordial para manutenção funcional do aloenxerto, este mesmo regime terapêutico induz estado de imunodepressão que predispõe o receptor a processos infecciosos potencialmente graves e de difícil manejo.^{9, 17}

As infecções podem afetar múltiplos sistemas orgânicos, com maior predileção pelo tecido mucocutâneo, trato urinário e sistema respiratório. A etiologia infecciosa nesta população apresenta distribuição característica, com predomínio de agentes bacterianos (46%) e virais (41%).¹⁷ O tratamento das infecções bacterianas segue, em princípio, os mesmos algoritmos utilizados na população imunocompetente, embora requeira considerações

farmacológicas adicionais relacionadas a vias de metabolização, excreção e potenciais interações medicamentosas com o regime imunossupressor.^{16, 17}

As infecções e reativações virais representam desafio particularmente complexo neste contexto clínico. O espectro de manejo é heterogêneo: para determinados agentes virais existem opções terapêuticas eficazes (como na hepatite C), para outros há possibilidade de profilaxia farmacológica (citomegalovírus), enquanto em alguns casos (como na infecção pelo vírus BK) as alternativas terapêuticas disponíveis são limitadas, com risco significativo de evolução para disfunção e perda do enxerto.^{9, 16, 17, 18}

A peculiaridade das manifestações clínicas das infecções virais em receptores de transplante merece destaque. Agentes que tipicamente causam manifestações autolimitadas em hospedeiros imunocompetentes podem, no contexto de imunossupressão, desencadear quadros graves como pneumonia intersticial, encefalite, infecção disseminada por varicela-zoster, lesões mucocutâneas extensas por herpes simplex e, em casos extremos, disfunção do enxerto e desfechos fatais decorrentes de complicações sistêmicas.^{17, 19, 20}

O período inicial de seis meses pós-transplante representa a fase de maior vulnerabilidade para infecções oportunistas, coincidindo com o regime imunossupressor mais intenso e o período de ajuste posológico. Após esta fase crítica, os pacientes podem ser estratificados em três grupos distintos conforme seu perfil de risco infeccioso.¹⁷

O primeiro grupo compreende pacientes com função estável do enxerto, regime imunossupressor otimizado e risco infeccioso aproximadamente equivalente ao da população geral, embora a preservação funcional do enxerto continue dependente de monitoramento multidisciplinar rigoroso.¹⁷

O segundo grupo inclui pacientes com infecção viral crônica estabelecida. Nesta categoria, observa-se progressão temporal para lesões orgânicas específicas (não envolvendo necessariamente o enxerto), exemplificadas por cirrose hepática em portadores crônicos de hepatite B e C.

O manejo imunossupressor frequentemente requer intensificação para manutenção funcional adequada do enxerto.¹⁷

O terceiro grupo engloba pacientes com função renal comprometida, necessitando imunossupressão intensificada e apresentando elevada susceptibilidade a episódios recorrentes, agudos e crônicos, de infecções oportunistas e reativações virais.¹⁷

Neste contexto, a vigilância virológica sistemática, associada a protocolos específicos de profilaxia e intervenção precoce, constitui elemento fundamental na estratégia de preservação do enxerto e redução da morbimortalidade associada a complicações infecciosas nesta população.

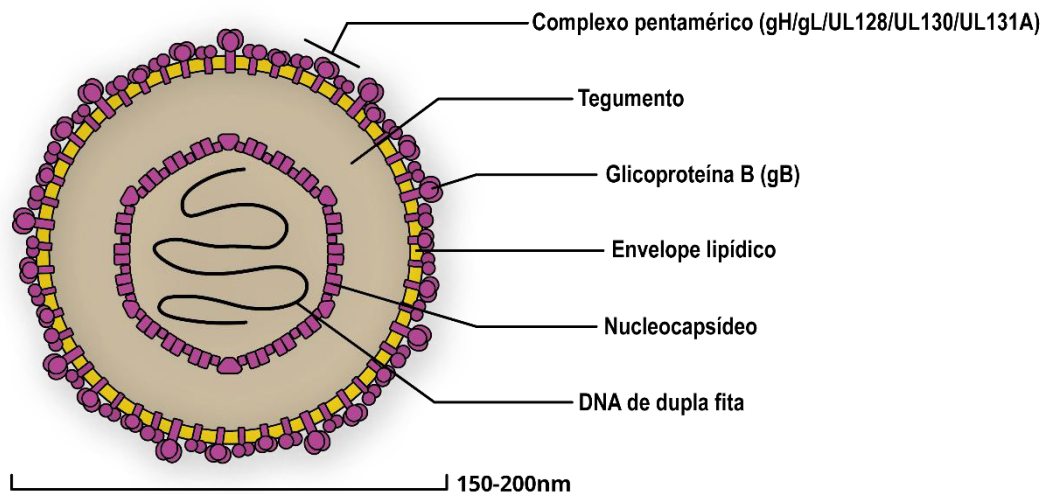
1.4. Os vírus e o transplante renal

1.4.1. Citomegalovírus

Durante o período crítico dos primeiros seis meses pós-transplante renal, quando a imunossupressão se encontra em seu ápice e os pacientes apresentam maior vulnerabilidade a infecções oportunistas, aproximadamente dois terços dos episódios febris são atribuíveis à reativação ou infecção primária pelo citomegalovírus (CMV).^{9, 17}

O CMV, taxonomicamente classificado como betaherpesvírus humano 5 (ordem *Herpesvirales*, gênero *Cytomegalovirus*), apresenta estrutura viral complexa. Seu envelope viral é constituído por um complexo proteico pentamérico e uma glicoproteína principal, com morfologia variando entre esférica e pleomórfica. O capsídeo viral é composto por 162 capsômeros circundados por tegumento amorfo, com dimensões da partícula viral oscilando entre 150-200nm (Figura 1). Seu material genético consiste em DNA de fita dupla com aproximadamente 200kB. A replicação viral ocorre no núcleo celular, podendo apresentar padrão lítico ou estabelecer latência (com replicação circular episossomal em tandem).^{21, 22}

Figura 1 | Diagrama do CMV



Referência: Shore, J. (2020, April 10). *The bumpy road to a cytomegalovirus vaccine*. The Native Antigen Company. Retrieved November 11, 2022, from <https://thenativeantigencompany.com/the-bumpy-road-to-a-cytomegalovirus-vaccine/>²²

O tropismo celular do CMV é mediado primariamente por sua interação com receptores de sulfato de heparana, o que teoricamente permite a infecção de qualquer célula de tecido conjuntivo ou componente do sistema hematopoiético. Embora o vírus demonstre tropismo preferencial por células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas durante a infecção ativa, no estado de latência apresenta predileção por células do tecido mieloide.²¹

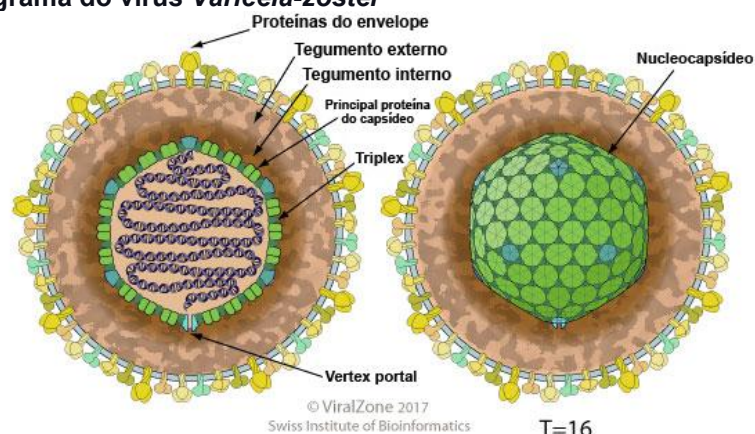
A estratégia profilática para prevenção da infecção por CMV em receptores de transplante renal baseia-se fundamentalmente na administração de valganciclovir, sendo indicada quando há sorologia positiva para CMV no doador e/ou receptor.^{9, 16, 17} Conforme as diretrizes internacionais atuais, incluindo as recomendações da *American Society of Transplantation Infectious Diseases* e o *Third International Consensus*, os pacientes são estratificados por risco, com duração da profilaxia geralmente estendida para seis meses em casos de alto risco (receptor CMV-negativo/doador CMV-positivo).^{5, 7, 8, 24} Estudos recentes têm avaliado estratégias alternativas, incluindo o uso de letermovir para profilaxia em receptores de alto risco, demonstrando não-inferioridade em relação ao valganciclovir com perfil favorável de resistência viral.^{4, 5}

A manifestação clínica da infecção por CMV em pacientes transplantados renais frequentemente inicia-se com síndrome febril, acompanhada de mialgia, artralgia, leucopenia e diarreia. Na ausência de intervenção terapêutica oportuna, a infecção pode evoluir para quadros graves como hepatite, pancreatite e pneumonia, condições associadas a taxas de mortalidade próximas a 15% nesta população específica.^{9, 17}

1.4.2. Vírus *Varicela-Zoster*

O vírus da *Varicela-zoster* (VZV), taxonomicamente classificado como herpesvírus humano 3 (ordem *Herpesvirales*, gênero *Varicellovirus*), apresenta estrutura viral comparável ao CMV. Seu capsídeo icosaédrico é constituído por 162 capsômeros, envolvido por tegumento amorfo bifásico (composto por porções interna e externa) e delimitado externamente por envelope lipoproteico. A morfologia viral varia entre esférica e pleomórfica, com partículas virais medindo entre 150-200nm²³ (Figura 2). O material genético viral consiste em DNA de fita dupla linear com aproximadamente 125kB. Similar a outros herpesvírus, sua replicação ocorre no compartimento nuclear, podendo estabelecer ciclo lítico produtivo ou estado de latência viral.²³

Figura 2 | Diagrama do vírus *Varicela-zoster*



Referência: SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Varicellovirus. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 19, 2022, from https://viralzone.expasy.org/179?outline=all_by_species²³

O tropismo celular do VZV é direcionado primariamente a células epiteliais da mucosa durante a infecção primária, enquanto no estado de latência demonstra predileção por neurônios sensoriais. A interação vírus-célula é mediada por receptores de manose-6-fosfato independentes de cátions, determinando seu padrão característico de disseminação e estabelecimento de latência em gânglios sensoriais.²³

A infecção por VZV manifesta-se clinicamente em duas apresentações distintas. A varicela (catapora) representa a infecção primária, predominantemente observada na população pediátrica. Após resolução da infecção primária, o vírus estabelece latência em gânglios nervosos sensoriais, com potencial de reativação posterior como herpes zoster, caracterizado por erupção vesicular dolorosa com distribuição dermatomérica, tipicamente unilateral. Em hospedeiros imunocompetentes, as manifestações clínicas do herpes zoster são geralmente autolimitadas, com resolução em aproximadamente quatro semanas. Entretanto, proporção significativa de pacientes pode desenvolver neuralgia pós-herpética, caracterizada por dor neuropática persistente, frequentemente refratária à terapia antiviral convencional com aciclovir.^{24, 25}

Em receptores de transplante renal submetidos à terapia imunossupressora, a reativação do VZV representa complicação potencialmente devastadora. Diferentemente do padrão localizado observado em hospedeiros imunocompetentes, estes pacientes apresentam risco significativamente aumentado de desenvolver infecção disseminada, com envolvimento cutâneo generalizado e potencial acometimento oftálmico, condição que pode resultar em comprometimento visual irreversível incluindo cegueira.^{24, 25, 26}

Particularmente preocupante nesta população específica é o potencial de disseminação visceral do VZV, manifestando-se como pneumonite intersticial, pancreatite aguda, hepatite viral, manifestações neurológicas centrais (encefalite, meningite, vasculopatia) e coagulação intravascular disseminada. Este espectro de complicações sistêmicas está associado a

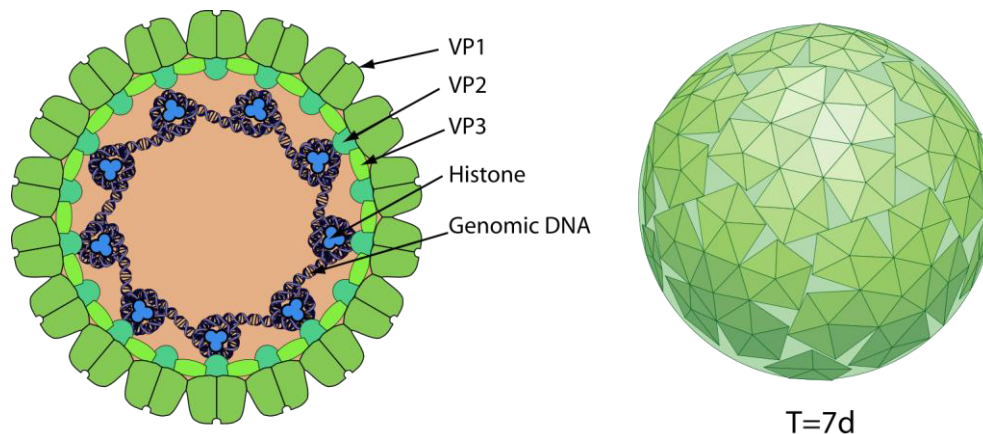
taxas significativas de morbimortalidade, representando emergência médica que requer intervenção terapêutica imediata.^{24, 25}

O diagnóstico precoce, fundamentado em alta suspeição clínica e confirmação laboratorial por métodos moleculares, associado à implementação imediata de terapia antiviral intravenosa em doses otimizadas e ajuste temporário do regime imunossupressor, constitui a base do manejo clínico das infecções por VZV em receptores de transplante renal. Adicionalmente, estratégias preventivas, incluindo vacinação pré-transplante (quando viável) e quimioprofilaxia pós-exposição em casos selecionados, representam componentes essenciais na abordagem integral destes pacientes.

1.4.3. Vírus BK

O vírus BK (BKV), taxonomicamente classificado na família *Polyomaviridae*, gênero *Alphapolyomavirus*, representa um desafio significativo no manejo de pacientes transplantados renais. Estruturalmente, caracteriza-se por genoma de DNA de fita dupla circular, com aproximadamente 5,2kB, codificando entre cinco e nove proteínas distribuídas em regiões genômicas funcionalmente distintas.²⁷ (Figura 3)

Figura 3 | Esquema do DNA de um poliomavírus humano



Referência: SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Polyomaviridae. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 20, 2022, from https://viralzone.expasy.org/148?outline=all_by_species²⁷

Morfológicamente, o BKV apresenta-se como partícula viral não envelopada com capsídeo icosaédrico, medindo aproximadamente 50nm de diâmetro. Seu tropismo celular primário direciona-se ao epitélio do trato respiratório durante a infecção primária, com capacidade de estabelecer latência persistente em células do parênquima renal. A interação vírus-célula é mediada por receptores de ácido siálico alpha 2,3 e receptores SV-40, determinando seu padrão característico de disseminação e estabelecimento de latência, com replicação predominantemente nuclear.²⁷

A infecção primária pelo BKV ocorre tipicamente durante a primeira infância, manifestando-se clinicamente como quadro febril leve associado a sintomas respiratórios inespecíficos. Estudos soropidemiológicos demonstram prevalência significativamente variável na população geral (40-100%, dependendo da coorte populacional estudada), indicando exposição universal ao vírus em determinadas regiões geográficas.^{9, 28, 29}

Em receptores de transplante renal submetidos a regimes imunossupressores, a reativação viral representa complicação potencialmente grave. Dados epidemiológicos indicam viremia detectável em aproximadamente 18% destes pacientes, dos quais menos de 10% desenvolvem manifestações clínicas associadas à replicação viral ativa. O

espectro de complicações relacionadas ao BKV nesta população específica inclui estenose uretral, cistite hemorrágica e, particularmente preocupante, nefropatia associada ao poliomavírus BK (BKVN), condição que pode culminar em disfunção irreversível e perda do enxerto renal.^{9, 28, 29}

A vigilância laboratorial sistemática para detecção precoce da reativação viral constitui componente fundamental no protocolo de acompanhamento pós-transplante. As diretrizes atuais recomendam monitoramento por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de urina por período mínimo de cinco anos após o transplante, com intervalos trimestrais durante os dois primeiros anos (período de maior risco) e avaliação anual subsequente. Em pacientes com suspeita clínica ou laboratorial de nefropatia associada ao BKV, a detecção de antígenos virais ou inclusões intranucleares características em espécimes de biópsia renal representa marcador patognomônico de comprometimento do enxerto, frequentemente associado a padrão histopatológico similar à rejeição aguda.^{9, 28, 29}

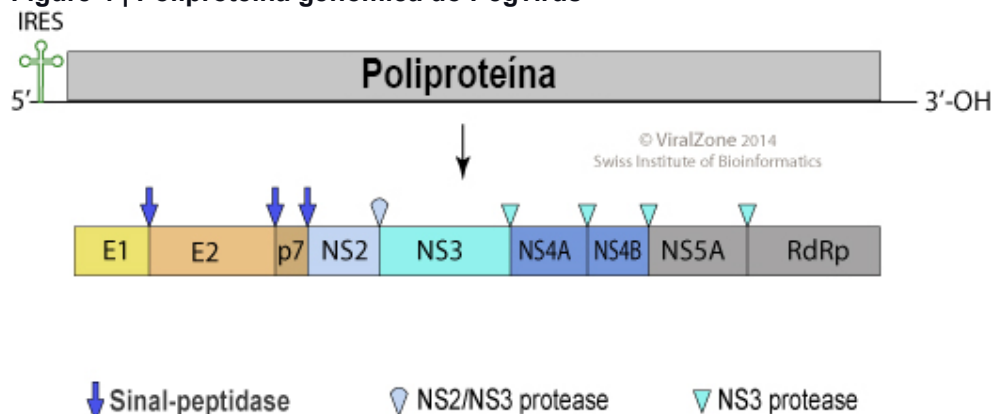
O manejo clínico da nefropatia por BKV fundamenta-se primariamente na redução criteriosa do regime imunossupressor, estratégia que permite restauração parcial da resposta imune celular específica contra o vírus. Adicionalmente, diversos agentes terapêuticos têm sido avaliados, incluindo cidofovir (em doses baixas), leflunomida, inibidores de mTOR e imunoglobulina intravenosa, embora evidências de eficácia consistente permaneçam limitadas.^{9, 28, 29}

1.4.4. Pegvirus humano

O pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1), anteriormente designado como vírus GB-C e vírus da Hepatite G, pertence taxonomicamente à família *Flaviviridae*, gênero *Pegivirus*. Estruturalmente, caracteriza-se como vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva, cujo genoma apresenta aproximadamente 10kB, codificando uma poliproteína que origina nove proteínas virais distintas por processamento pós-traducional (Figura 4). O

tropismo celular do HPgV-1 direciona-se predominantemente a células esplênicas e componentes mononucleares do sangue periférico.³⁰

Figure 4 | Poliproteína genômica do Pegvirus



Referência: SIB Swiss Institute of Bioinformatics (2014). Pegivirus. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 21, 2022, from <https://viralzone.expasy.org/4860>³⁰

A identificação inicial do HPgV-1 ocorreu em contexto clínico de hepatite aguda de etiologia indeterminada, o que lhe garantiu a nomenclatura de vírus da hepatite G. Entretanto, investigações subsequentes não conseguiram estabelecer correlação entre a infecção viral e hepatotropismo ou hepatopatia, fundamentando a revisão de sua nomenclatura e classificação taxonômica, com abandono da designação "vírus da Hepatite G".^{31, 32} Dados epidemiológicos estimam que o material genético viral possa ser detectado em aproximadamente 750 milhões de indivíduos globalmente, sem evidências consistentes de patogenicidade em humanos. Prevalência significativamente elevada é observada em populações específicas, incluindo receptores de múltiplas transfusões, indivíduos com exposição parenteral recorrente, portadores de hepatite C, pacientes infectados pelo HIV e receptores de transplantes de órgãos.^{33, 34}

Estudos científicos recentes têm correlacionado de forma intrigante a presença do HPgV-1 e evolução clínica favorável em diversas condições patológicas, incluindo hepatite B, infecção pelo vírus Ebola e, particularmente, infecção pelo HIV.^{35, 36, 37} Estudos clínicos demonstraram que a viremia persistente por HPgV-1 associa-se a múltiplos desfechos benéficos em pacientes HIV-positivos, incluindo: redução da carga viral do HIV, resposta

otimizada à terapia antirretroviral, diminuição nas taxas de transmissão vertical e redução significativa na mortalidade global.^{36, 38} Os mecanismos moleculares e imunológicos subjacentes a estes efeitos protetores permanecem não elucidados, embora representem perspectiva promissora para desenvolvimento de novas abordagens experimentais.

Considerando o possível potencial imunomodulador do HPgV-1 demonstrado em outras condições clínicas, investigações preliminares têm sido conduzidas em populações de pacientes transplantados (incluindo receptores de transplante renal), população submetida a regimes imunossupressores específicos para manutenção funcional do enxerto. Até o momento, os estudos disponíveis não demonstraram impacto clínico consistente, positivo ou negativo, da infecção por HPgV-1 neste contexto específico, caracterizando área de investigação ainda insuficientemente explorada pela comunidade científica.^{39, 40}

O HPgV-1 representa modelo viral peculiar de coexistência não patogênica e potencialmente benéfica com o hospedeiro humano, com implicações significativas para compreensão das interações vírus-hospedeiro e desenvolvimento de estratégias imunomoduladoras inovadoras. Estudos adicionais são necessários para caracterização precisa do impacto da infecção por HPgV-1 em receptores de transplante renal, considerando particularmente os efeitos potenciais na modulação da resposta imune e sua interação com o regime imunossupressor.

1.5 O diagnóstico das infecções virais

1.5.1. As bases do diagnóstico

O diagnóstico e monitoramento de infecções virais em receptores de transplante renal requer abordagem por métodos diversos, integrando modalidades diagnósticas complementares. O arsenal diagnóstico convencional inclui isolamento viral em cultura celular, métodos sorológicos para detecção de anticorpos específicos e técnicas de biologia molecular para

identificação direta de ácidos nucleicos virais. Esta abordagem integrada possibilita a determinação etiológica precisa de manifestações clínicas em pacientes transplantados, permitindo intervenção terapêutica precoce em cenários específicos e, em determinados contextos, antecipação de potenciais desfechos clínicos desfavoráveis, viabilizando estratégias preventivas ou preparatórias.^{9, 16, 17}

1.5.2. Tecnologia de sequenciamento de nova geração

O desenvolvimento exponencial das metodologias de diagnóstico molecular nas últimas décadas revolucionou o campo da virologia experimental e clínica, possibilitando análises com rapidez, precisão e capacidade de processamento sem precedentes.

O sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) representa paradigma diagnóstico inovador com capacidade de geração massiva de dados. A tecnologia de sequenciamento de DNA foi inicialmente desenvolvida em 1977 por Frederick Sanger, fundamentando transformação radical na compreensão científica da genética e, contemporaneamente, viabilizando abordagens diagnósticas laboratoriais personalizadas.⁴¹

Embora cronologicamente anterior à reação em cadeia da polimerase, o sequenciamento permaneceu tecnologia de acesso restrito até recentemente, limitado por custos proibitivos, complexidade técnica e demandas temporais extensas para análise de segmentos genômicos relativamente pequenos.⁴² Para contextualização histórica, o Projeto Genoma Humano demandou treze anos para sua conclusão em 2003, com investimento aproximado de US\$ 2,7 bilhões, em esforço colaborativo multinacional. Em contraste paradigmático, estimativas de 2015 indicavam que projeto equivalente poderia ser executado em período de um ano, utilizando plataforma única de sequenciamento, com custo aproximado de US\$ 1.500.⁴³

A evolução tecnológica no campo do sequenciamento contemplou múltiplas inovações metodológicas, incluindo automação do método de Sanger, desenvolvimento da degradação química (Maxam-Gilbert), pirosequenciamento e, finalmente, as plataformas de sequenciamento de nova geração.⁴⁴ A redução dramática nos custos operacionais proporcionada pelo NGS viabilizou sua incorporação na medicina personalizada, particularmente nos campos da genética médica e oncologia.^{45, 46}

No âmbito da pesquisa biomédica, esta revolução tecnológica possibilitou abordagens metodológicas inovadoras e aquisição de dados com qualidade e celeridade sem precedentes, expandindo significativamente o conhecimento científico em biologia evolutiva, microbiologia, virologia e, particularmente relevante para o presente estudo, metagenômica viral.^{42, 43, 44}

A aplicação das tecnologias de sequenciamento de nova geração no rastreamento virológico, especialmente em populações imunocomprometidas como receptores de transplante renal, representa fronteira diagnóstica promissora, permitindo identificação de patógenos virais não contemplados em painéis diagnósticos convencionais, caracterização de variantes virais com implicações terapêuticas e melhor compreensão da dinâmica do viroma humano em estados de imunossupressão.⁴⁷

1.5.3. O sequenciamento de nova geração e a pesquisa no campo da metagenômica

A metagenômica representa um campo científico emergente dedicado à análise genômica abrangente de comunidades microbianas complexas presentes em diversos nichos ecológicos. Esta abordagem metodológica transcende as limitações dos métodos diagnósticos convencionais dependentes de cultivo ou detecção dirigida, permitindo caracterização taxonômica e funcional integral de ecossistemas microbianos. Diversas matrizes biológicas e ambientais têm sido submetidas à análise metagenômica, gerando dados fundamentais para intervenções ambientais, aplicações clínicas e investigações epidemiológicas. Esta área do

conhecimento tem experimentado expansão exponencial nas últimas décadas, fornecendo contribuições significativas para múltiplos campos científicos, incluindo ecologia microbiana, microbiologia clínica, epidemiologia molecular, virologia e genômica funcional.^{45,46, 48, 49, 50}

Paralelamente aos estudos metagenômicos focalizados em comunidades bacterianas, a caracterização de populações virais em diversos materiais biológicos tem emergido como área de investigação particularmente promissora. Ao conjunto de genomas virais identificados em determinado nicho ecológico atribui-se a designação de viroma. O protocolo metodológico para análise do viroma compreende etapas cruciais de processamento pré-analítico, incluindo técnicas específicas de enriquecimento e concentração do material genético viral presente na amostra, seguidas pelo processo de sequenciamento de nova geração propriamente dito.⁵¹

A implementação das tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) viabilizou avanços significativos na vigilância virológica ambiental, permitindo monitoramento da circulação de determinados vírus em populações específicas através da análise de matrizes ambientais, como a água e esgoto. Adicionalmente, estas metodologias têm ampliado substancialmente o conhecimento sobre a composição, diversidade e dinâmica do viroma humano em diferentes populações estudadas globalmente.^{52, 53}

No contexto do transplante renal, a análise metagenômica do viroma sanguíneo representa abordagem diagnóstica inovadora, potencialmente capaz de identificar agentes virais não contemplados nos protocolos diagnósticos convencionais, caracterizar variantes virais com implicações clínicas relevantes e proporcionar compreensão mais abrangente das interações entre o viroma e o estado de imunossupressão característico desta população específica.

A aplicação clínica da metagenômica viral em receptores de transplante renal oferece perspectiva para identificação precoce de agentes potencialmente patogênicos, caracterização de coinfeções virais complexas e desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas

fundamentadas no viroma individual. Adicionalmente, estudos longitudinais do viroma nesta população específica podem elucidar aspectos cruciais da patogênese viral em estados de imunossupressão e identificar biomarcadores virológicos preditivos de desfechos clínicos relevantes.

1.5.4. O viroma humano

Estudos contemporâneos estimam que o corpo humano abriga aproximadamente 10^{13} partículas virais, constituindo composição viral de extraordinária complexidade. O viroma humano caracteriza-se por notável diversidade taxonômica, compreendendo vírus que infectam procarióticos (bacteriófagos) e infectam eucarióticos. Estes últimos possuem capacidade de infectar células humanas, potencialmente desencadeando manifestações patológicas, embora significativa proporção possa persistir no organismo por períodos prolongados sem induzir alterações clínicas detectáveis. Paralelamente, os vírus que infectam procarióticos têm sido extensivamente investigados considerando seu potencial impacto na modulação da microbiota humana e, conseqüentemente, na homeostase fisiológica e estado de saúde do hospedeiro.^{54, 55}

A composição do viroma humano apresenta heterogeneidade significativa conforme a localização anatômica considerada, refletindo a diversidade de nichos ecológicos presentes no organismo. Adicionalmente, o perfil virológico individual caracteriza-se por singularidade notável, sendo influenciado por múltiplos determinantes extrínsecos e intrínsecos. Apesar do crescente volume de publicações científicas neste campo, o conhecimento atual sobre o viroma humano permanece fragmentado, demandando investigações adicionais. Determinadas populações específicas têm sido preferencialmente estudadas, incluindo pacientes com doenças do trato gastrointestinal, condições autoimunes, infecção pelo HIV e receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas.⁵⁴

Entre os fatores extrínsecos que influenciam a composição do viroma humano, destaca-se o padrão alimentar. Evidências científicas indicam que

indivíduos submetidos a regimes dietéticos similares apresentam perfis virológicos comparáveis, contrastando com aqueles expostos a padrões alimentares distintos. Particularmente relevante, a amamentação demonstra impacto significativo no viroma infantil, conferindo maior resistência a gastroenterites virais em lactentes alimentados com leite materno comparativamente àqueles privados desta prática.^{56, 57}

A contribuição do componente genético na determinação do viroma permanece tema controverso. Determinados estudos sugerem influência genética significativa na composição virológica, fundamentados na observação de perfis virais substancialmente semelhantes em gêmeos monozigóticos, contrastando com a heterogeneidade observada em gêmeos dizigóticos. Entretanto, interpretações alternativas propõem que as variações observadas em estudos com componente genético estariam primariamente relacionadas a fatores ambientais compartilhados, minimizando a contribuição genotípica.^{58, 59, 60}

A distribuição geográfica constitui determinante adicional da diversidade do viroma humano, considerando padrões regionais específicos de circulação viral, com consequente reflexo no perfil virológico das populações locais.^{61, 62}

No contexto da inter-relação entre viroma e estados patológicos, duas hipóteses principais emergem: alterações primárias no viroma potencialmente induzindo condições patológicas *versus* estados mórbidos desencadeando modificações secundárias no perfil virológico.^{54, 55} Ressalta-se que a evidência científica atual é insuficiente para estabelecer relação causal definitiva entre alterações do viroma e desenvolvimento de doenças específicas. Entretanto, observações consistentes documentam perfis virológicos distintivos em determinadas condições patológicas quando comparadas a indivíduos saudáveis. Exemplificando, pacientes com doenças inflamatórias intestinais apresentam caracteristicamente redução na abundância de bacteriófagos da família *Microviridae* e expansão de vírus da ordem *Caudovirales*, contrastando com o padrão observado em indivíduos hígidos.⁶³

Especificamente para receptores de transplante renal, a literatura científica disponível sobre metagenômica sanguínea e, particularmente, caracterização do viroma, é notavelmente escassa.^{64, 65, 66} A ampliação do conhecimento sobre o perfil virológico desta população específica apresenta potencial significativo para aprimoramento do acompanhamento clínico e otimização de desfechos terapêuticos.

A caracterização abrangente do viroma em receptores de transplante renal poderia proporcionar identificação precoce de agentes virais potencialmente patogênicos, elucidação de interações virais complexas em contexto de imunossupressão farmacológica, desenvolvimento de biomarcadores virológicos preditivos de complicações específicas e, ultimamente, fundamentação de abordagens terapêuticas personalizadas com impacto significativo na sobrevida do enxerto e do paciente.

2. JUSTIFICATIVA

As infecções e reativações virais representam desafio crítico no manejo clínico de pacientes submetidos a transplante renal, constituindo causa significativa de morbidade, disfunção do enxerto e mortalidade nesta população específica. Aproximadamente 34% dos receptores de transplante renal desenvolvem complicações virais clinicamente significativas, com potencial impacto devastador na sobrevida do enxerto e do paciente.^{9, 17, 18} Neste contexto, a implementação de tecnologias diagnósticas de alta resolução, como o sequenciamento de nova geração (NGS) aplicado à metagenômica viral, emerge como estratégia promissora para abordagem personalizada e abrangente desta problemática clínica.^{41, 42}

A metodologia diagnóstica convencional para investigação de infecções virais em pacientes transplantados apresenta limitações fundamentais que comprometem sua eficácia clínica.^{9, 16, 17}

A vigilância metagenômica do viroma sanguíneo em receptores de transplante renal oferece perspectivas adicionais além do diagnóstico específico de infecções clinicamente manifestas.⁶⁷ Esta abordagem possibilita caracterização longitudinal da dinâmica viral em contexto de imunossupressão farmacológica, potencialmente identificando biomarcadores virológicos preditivos de complicações específicas antes de sua manifestação clínica. Este monitoramento preditivo poderia fundamentar intervenções terapêuticas populacionais, prevenindo o desenvolvimento de complicações graves em determinado grupo de pacientes. Adicionalmente, a caracterização do perfil virológico individual poderia orientar a personalização do regime imunossupressor, minimizando riscos de reativação viral específica sem comprometer a prevenção da rejeição do enxerto.

A aplicação da metagenômica viral em transplantados renais representa, em essência, materialização do conceito de medicina personalizada e de precisão, viabilizando abordagem diagnóstica e terapêutica fundamentada em características individuais específicas, sem deixar de lado o contexto populacional.^{67,68} Assim como o sequenciamento do

genoma humano revolucionou múltiplos campos da medicina, a caracterização do viroma individual promete transformar nossa compreensão das interações patógeno-hospedeiro em estados de imunossupressão, estabelecendo novo paradigma no cuidado de pacientes transplantados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Empregar a ferramenta de sequenciamento de nova geração para identificação de agentes virais presentes em amostras de pacientes submetidos ao transplante renal
- Caracterizar o viroma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante renal através da metagenômica viral.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as prevalências relativas de vírus clinicamente relevantes em transplantados renais, com ênfase em Citomegalovírus (CMV), Pegivírus Humano do tipo 1 (HPgV-1), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus Varicela-Zoster (VZV) e Poliomavírus BK (BKV);
- Estabelecer correlações entre o perfil do viroma sanguíneo e características clínico-demográficas dos pacientes, incluindo idade, sexo, tempo pós-transplante;
- Realizar análise filogenética dos HPgV-1, para caracterização de genótipos circulantes;
- Levantar dados do viroma sanguíneo de transplantados renais no HUB, contribuindo para o conhecimento epidemiológico viral nesta população específica;

4. MÉTODOS

4.1. Pacientes e coleta de amostras

Entre junho de 2018 e agosto de 2021, um total de 100 receptores de transplante renal (58 homens e 42 mulheres) em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Distrito Federal, Brasil, foram selecionados para participação no presente estudo. As amostras biológicas foram coletadas entre junho de 2018 e agosto de 2021, durante as consultas programadas dos pacientes para exames laboratoriais de rotina. De cada participante, foi coletado 5 mL de sangue total em tubos vacutainers estéreis contendo EDTA como anticoagulante (Vacuette, Greiner Bio-One, Americana, São Paulo, Brasil). Para a obtenção do plasma, as amostras foram submetidas a centrifugação a baixa velocidade ($1931\times g$ por 10 minutos). Após a separação, o plasma foi imediatamente aliquotado e armazenado a -80°C até o momento das análises laboratoriais.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil CEP-FCE/UnB, onde tramitou sob o processo n.º CAAE 83811718.8.0000.8093. Todos os pacientes foram devidamente informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente à inclusão na pesquisa, conforme preconizado pela resolução CNS 466/2012.

4.2. Preparação de amostras e sequenciamento Illumina

Para a eliminação do DNA hospedeiro e bacteriano livre, alíquotas de 400 μL de plasma de cada paciente foram submetidas ao tratamento enzimático com o kit Turbo DNase (Turbo DNA-free, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brasil) a 37°C por 30 minutos. Após a etapa de inativação das DNases, procedeu-se à formação de *pools* de amostras, onde cinco amostras

de diferentes pacientes foram combinadas, totalizando 20 *pools* para as 100 amostras coletadas.

O volume total de cada *pool* foi processado para extração de ácidos nucleicos utilizando o kit High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche, São Paulo, Brasil), com modificações específicas no protocolo padrão. As modificações incluíram a utilização do transportador GenElute™ Linear (LPA) (Merck, São Paulo, Brasil) para otimização da concentração dos ácidos nucleicos virais e o uso de isopropanol para a etapa de precipitação. Os ácidos nucleicos virais extraídos foram eluídos em 50µL de água livre de nucleases, previamente aquecida a 70°C.

O material genético obtido foi submetido à transcrição reversa empregando-se o sistema Superscript III First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brasil), seguindo rigorosamente as especificações do fabricante. Posteriormente, realizou-se a amplificação do cDNA sintetizado com o QuantiTect Whole Transcriptome Kit (QIAGEN, São Paulo, Brasil).

Para o sequenciamento de nova geração, as bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando-se o kit Illumina DNA Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA) com o IDT para índices Illumina DNA/RNA UD, conforme instruções do fabricante. O sequenciamento foi executado na plataforma Illumina NovaSeq 6000, empregando-se o kit de reagentes NovaSeq 6000 S1 (300 ciclos) (Illumina, San Diego, CA, EUA), seguindo estritamente o protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.3. Análise de bioinformática

A análise metagenômica viral foi executada seguindo um pipeline de bioinformática previamente estabelecido e validado.⁶⁹ Inicialmente, a avaliação da qualidade das sequências brutas foi realizada utilizando-se o FastQC versão 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para a seleção de sequências com parâmetros de qualidade adequados, foram aplicados

filtros sequenciais com o Trimmomatic versão 0.3.9 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) e Cutadapt versão 2.4.10 (<https://cutadapt.readthedocs.io/>). Um refinamento adicional foi implementado através do software AfterQC v.0.9.7.11 (<https://github.com/OpenGene/AfterQC>), visando otimizar a qualidade global das sequências para as análises subsequentes. A classificação taxonômica do viroma foi determinada empregando-se o Kraken2 versão 2.0.8 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2>). Esta ferramenta também foi utilizada para identificação e remoção das leituras correspondentes ao genoma humano e de outros organismos não-virais (bactérias e/ou parasitas), as quais foram excluídas das etapas analíticas posteriores. Para a geração de *contigs* virais, procedeu-se à montagem *de novo* utilizando-se o SPAdes versão 3.13.0 (<http://cab.spbu.ru/software/spades>). A classificação taxonômica final, baseada na identidade proteica, foi realizada por uma abordagem sequencial de alinhamento, iniciando com Blastn seguido de Blastx, utilizando o software Diamond versão 0.9.29 (<https://github.com/bbuchfink/diamond>).

4.4. Confirmação dos resultados

Para confirmação dos resultados obtidos pela abordagem metagenômica viral, os *pools* foram testados para os vírus Varicella-zoster (VZV), Citomegalovírus humano (HCMV), vírus Epstein-Barr (EBV) e Pegvírus humano do tipo 1 (HPgV-1). Estes *pools* foram abertos e submetidos à confirmação diagnóstica mediante ensaios de PCR em tempo real com *primers* e sondas específicas para cada agente viral. Adicionalmente, todas as amostras foram testadas para a presença do Herpesvírus humano 6 (HHV-6), utilizado como controle negativo do procedimento analítico, uma vez que nenhum dos *pools* analisados pela demonstrou a presença deste vírus nos receptores de transplante renal.

4.4.1. Extração do RNA viral de HPgV-1 e detecção por RT-qPCR

Os ácidos nucleicos virais foram extraídos de forma automatizada utilizando-se o kit EXTRACTA FAST-DNA and RNA Viral no equipamento EXTRACTA 32 (Loccus, Brasil), seguindo rigorosamente as instruções preconizadas pelo fabricante. A detecção do RNA do Pegivírus humano tipo 1 (HPgV-1) foi realizada por meio de RT-qPCR, empregando-se o sistema GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. O programa de ciclagem térmica foi constituído por uma etapa inicial de transcrição reversa (RT) a 40°C durante 40 minutos; seguida por inativação da transcriptase reversa e início da desnaturação (1 ciclo) a 95°C por 2 minutos; e subsequente amplificação durante 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores e sonda, direcionados à região 5'-UTR do genoma viral: RTG1 5'-GTGGTGGATGGGTGATGACA-3' (*forward*), RTG2 5'-GACCCACCTATAGTGGCTACCA-3' (*reverse*) e NFQ 5'-FAM-CCGGGATTACGACCTACC-3' (sonda de hidrólise).⁷⁰

4.4.2. Amplificação da região 5'-UTR do HPgV-1 por RT-PCR Nested

Após a confirmação das amostras positivas para HPgV-1, procedeu-se à amplificação da região 5'-UTR do genoma viral para posterior genotipagem. Inicialmente, a transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se a enzima High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA), conforme as recomendações do fabricante, empregando-se o oligonucleotídeo iniciador GUTR.R01 (5'-AATGCCACCCGCCCTCA-3'). O protocolo de PCR-Nested foi adaptado de estudos previamente publicados.^{71, 72} Em síntese, ambas as rodadas da PCR-Nested foram conduzidas em um volume final de 50 µL contendo: 5 µL de cDNA (o produto da primeira reação foi utilizado como molde para a segunda

rodada), tampão de PCR 1×, MgCl₂ 1,5 mM, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 μM de dNTPs e 1,25 U/reação de DNA polimerase Taq recombinante (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). Para a primeira reação, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GUTR.F01, 5'-GGTTGGTAGGTCGTAAATCCCG-3' (*forward*) e GUTR.R01, 5'-ATGCCACCCGCCCTCA-3' (*reverse*). Para a segunda reação, foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores GUTR.F02, 5'-GTAGGTCGTAAATCCCGGTCA-3' (*forward*) e GUTR.R02, 5'-CGAAGGATTCTTGGGCTACC-3' (*reverse*). As reações de PCR-Nested foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Para ambas as rodadas de PCR-Nested, utilizou-se o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos (40 ciclos para a segunda reação) de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR-Nested (fragmento de 379 nucleotídeos) foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta (UV) utilizando-se o sistema de fotodocumentação L-PIX TOUCH (Loccus, São Paulo, Brasil).

4.4.3. Análise filogenética do HPgV-1

O sequenciamento da região 5'-UTR foi realizado em sequenciador automático ABI 3500 XL, utilizando-se o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), com o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Os eletroferogramas obtidos foram inicialmente analisados através do programa BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Califórnia, EUA). Para obtenção das sequências de referência do HPgV-1, foram recuperados 71 genomas completos disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se

os termos de busca “GBV-C”, “*hepatitis G*”, “*Human pegivirus-1*” e “*complete genome*”. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o programa MAFFT⁷³ e posteriormente refinado manualmente através do software Aliview⁷⁴. As reconstruções filogenéticas foram geradas pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o programa IQ-TREE⁷⁵ com suporte estatístico de *bootstrap* de 1.000 réplicas. O modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais adequado foi determinado através do algoritmo ModelFinder Plus (MFP). A visualização e edição gráfica das árvores filogenéticas foram executadas utilizando-se o programa FigTree.⁷⁶

4.4.4. Confirmação de BKV por qPCR

Os *pools* positivos para sequências de Poliomavírus BK (BKV) e Citomegalovírus humano (CMV) foram submetidos à técnica de PCR quantitativa (qPCR). A detecção do BKV foi realizada utilizando-se o kit BKV ELITe MGB® (ELITechGroup S.p.A., Corso Svizzera 185, 10149 Torino, Itália), seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, a qPCR foi executada no equipamento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. As reações foram conduzidas em volume final de 40 µL, contendo 20 µL de mistura de reação BKV Q-PCR Mix e 20 µL de ácidos nucleicos extraídos. Todos os controles positivos e negativos necessários foram devidamente aplicados. Foi utilizado o seguinte protocolo térmico: incubação inicial a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 20 segundos. Uma etapa adicional de dissociação foi realizada a 95°C por 15 segundos, 40°C por 1 minuto e 80°C por 15 segundos.

4.4.5. Confirmação de CMV por qPCR

A detecção do DNA do CMV foi realizada utilizando-se o ensaio Abbott RealTime CMV para uso investigacional (ensaio RT) na plataforma Abbott

m2000 (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

4.4.6. Confirmação de EBV e HHV-6 por qPCR

Para a detecção de EBV e HHV-6, foi utilizado o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) conforme os protocolos publicados por Fellner e Gautheret-Dejean respectivamente.^{73, 74}

4.4.7. PCR em tempo real para detecção de VZV

Para a detecção de VZV foi utilizado o kit Allplex Meningitis-V1 Assay (Seegene™, Songpa-gu, Seoul, Coréia do Sul) conforme as orientações do fabricante.

4.4.8. Análise estatística

A ferramenta online <http://www.winepi.net> foi utilizada para calcular a prevalência de DNA/RNA de HPgV-1, EBV, CMV e BKV encontrada no presente estudo, bem como para estimar a prevalência verdadeira considerando-se o número total de transplantes renais realizados no Hospital Universitário de Brasília até agosto de 2021 (352 receptores de transplante renal). Para esta análise, foram considerados valores de sensibilidade e especificidade de 100% para os testes diagnósticos empregados na detecção do DNA viral. O teste t de Student foi aplicado para comparar as médias de idade entre os grupos estudados (homens *versus* mulheres e positivos *versus* negativos para DNA de CMV ou BKV), enquanto o teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a prevalência de infecções por HPgV-1, EBV, CMV e BKV entre estes grupos.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da população estudada

O presente estudo analisou amostras de 100 receptores de transplante renal, dos quais 58 (58,0%) eram do sexo masculino e 42 (42,0%) do sexo feminino. A idade média dos participantes foi de $49,6 \pm 13,2$ anos, observando-se uma média de idade de $51,3 \pm 12,5$ anos para os homens e $47,2 \pm 14,1$ anos para as mulheres (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição por sexo e idade média dos participantes do estudo.

Sexo	n (%)	Idade média $\pm$ desvio padrão (anos)
Masculino	58 (58,0%)	$51,3 \pm 12,5$
Feminino	42 (42,0%)	$47,2 \pm 14,1$
Total	100 (100,0%)	$49,6 \pm 13,2$

Em relação à autodeclaração de raça/cor, predominaram indivíduos pardos (84,0%), seguidos por brancos (13,0%), pretos (1,0%) e 2,0% dos participantes não declararam sua raça/cor (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos participantes segundo raça/cor autodeclarada e sexo.

Raça/cor autodeclarada	Masculino n (%)	Feminino n (%)	Total n (%)
Parda	50 (86,2%)	34 (81,0%)	84 (84,0%)
Preta	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (1,0%)
Branca	7 (12,1%)	6 (14,3%)	13 (13,0%)
Não declarada	2 (3,4%)	0 (0,0%)	2 (2,0%)
Total	58 (100,0%)	42 (100,0%)	100 (100,0%)

Quanto ao tempo decorrido desde o transplante renal até o momento da coleta das amostras, observou-se que a maioria dos participantes (28,0%) se encontrava no período entre 7 e 9 anos pós-transplante, seguidos pelos

que estavam entre 1 e 3 anos (26,0%) e entre 4 e 6 anos (23,0%) após o procedimento (Tabela 6).

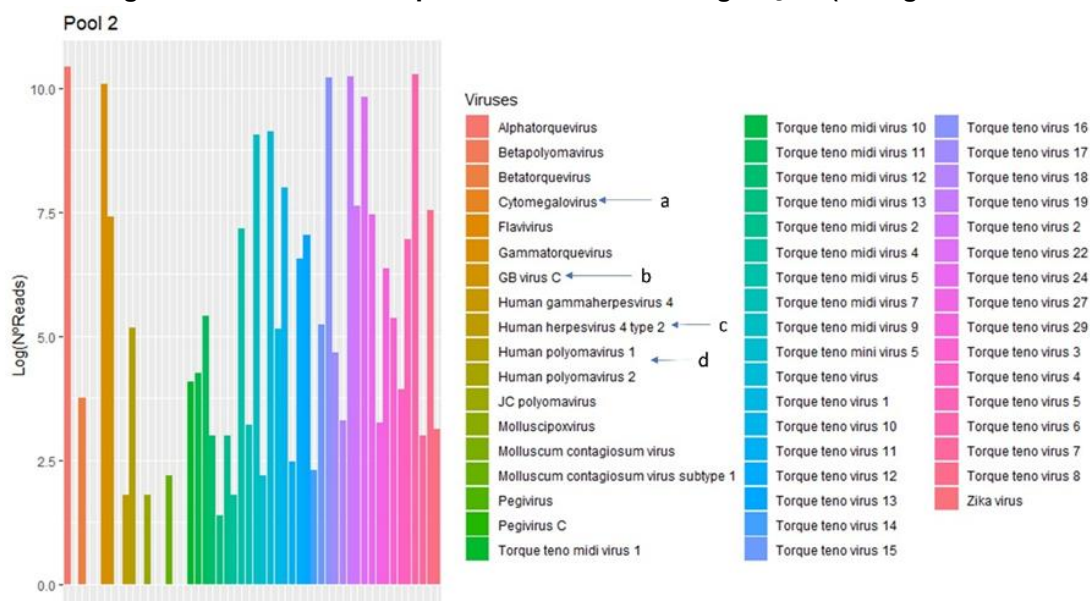
Tabela 6. Distribuição dos participantes segundo o tempo pós-transplante no momento da coleta da amostra.

Tempo pós-transplante	Masculino n (%)	Feminino n (%)	Total n (%)
Não informado	2 (3,4%)	1 (2,4%)	3 (3,0%)
< 1 ano	7 (12,1%)	8 (19,0%)	15 (15,0%)
Entre 1 e 3 anos	15 (25,9%)	11 (26,2%)	26 (26,0%)
Entre 4 e 6 anos	12 (20,7%)	11 (26,2%)	23 (23,0%)
Entre 7 e 9 anos	17 (29,3%)	11 (26,2%)	28 (28,0%)
≥ 10 anos	3 (5,2%)	2 (4,8%)	5 (5,0%)
Total	58 (100,0%)	42 (100,0%)	100 (100,0%)

5.2. Metagenômica viral

O sequenciamento foi bem-sucedido em todos os 20 *pools* amostrais, adotando-se como balizador para detecção viral o limiar mínimo de 5 *reads* por agente. A Figura 5, ilustra o perfil metagenômico obtido em um dos *pools* analisados.

Figura 5. Análise do sequenciamento de nova geração (metagenômica viral)



Legenda: figura representativa (*pool* 2). Observa-se nas setas indicativas a presença de CMV (a), HPgV-1 (b), EBV (c) e do vírus da família *Polyomaviridae* (BKV confirmado) (d).

Para validação dos resultados obtidos pela abordagem metagenômica, foi implementada a detecção molecular por PCR quantitativa (qPCR) direcionada a agentes virais de relevância clínica identificados no sequenciamento, incluindo Citomegalovírus humano (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus Varicella-zoster (VZV) e Pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1). Adicionalmente, o Herpesvírus humano 6 (HHV-6) foi utilizado como controle negativo do procedimento, considerando sua ausência nos resultados metagenômicos preliminares. Além disso, o vírus Torque Teno (TTV) foi amplamente identificado em grande parte dos *pool/s*, conforme o esperado. Ao longo dos últimos anos, estes vírus têm sido indicados como potenciais indicadores de competência para imunidade celular. Tendo em vista que pacientes transplantados renais estão submetidos a rigoroso regime de imunomodulação, especialmente com inibidores da ativação e proliferação de linfócitos T, é de se esperar que o vírus tenha maior capacidade de replicação nesta população.

Vale aqui ressaltar que o presente estudo utilizou amostras provenientes de uma soroteca previamente estabelecida, caracterizando-se,

portanto, como um estudo transversal que se utilizou de amostras de oportunidade. Diferentemente de investigações com delineamento prospectivo, nas quais é possível estabelecer um sistema padronizado de coleta que assegure volume amostral adequado para todos os experimentos previstos, a utilização de material biológico previamente armazenado impôs limitações técnicas importantes.

Uma restrição significativa foi o volume insuficiente de algumas amostras para a realização da totalidade dos testes laboratoriais propostos (qPCR), o que resultou em variabilidade no número amostral utilizado para cada análise específica. Esta limitação determinou a necessidade de uma abordagem analítica compartimentada, em que cada agente viral investigado foi avaliado separadamente, considerando o conjunto amostral disponível para sua detecção. Consequentemente, os resultados referentes a cada patógeno viral serão apresentados de forma individualizada, com variações no denominador amostral conforme a disponibilidade de material biológico viável para cada análise específica.

5.3. Prevalência e caracterização genotípica do Pegivírus humano tipo 1

Dos 20 *pools* da metagenômica, 19 foram analisados por qPCR, 15 apresentaram positividade para RNA do Pegivírus humano tipo 1 (HPgV-1). Subsequentemente, as amostras individuais provenientes destes *pools* (95 amostras) foram testadas separadamente por RT-qPCR para detecção do RNA viral. A frequência estimada de HPgV-1 na população estudada foi de 20,0% (n=19/95), com idade média dos indivíduos positivos de $41,6 \pm 12,9$ anos. Observou-se maior prevalência em receptores de transplante renal do sexo feminino (29,3%; n=12/41; idade média $41,2 \pm 12,9$ anos) comparados aos do sexo masculino (13,0%; n=7/54; idade média $42,3 \pm 7,6$ anos). A análise estatística demonstrou que a prevalência verdadeira estimada variou entre 13,1% e 26,9%, considerando-se o número total de receptores de

transplante renal atendidos no Hospital Universitário de Brasília até agosto de 2021 (352 pacientes transplantados) (Tabela 1).

Tabela 7. População estudada e prevalência de RNA do HPgV-1.

Características	Masculino	Feminino	Total	Prevalência verdadeira estimada (IC 95%)
N (%)	54 (56,8%)	41 (43,2%)	95 (100%)	—
Idade média (± DP)	47,5 (±12,6)	43,2 (±15,4)	45,3 (±14,1)	—
HPgV-1 RNA +	7 (13,0%)	12 (29,3%)	19 (20,0%)*	13,1% a 26,9%**
Idade média (± DP) dos positivos	42,3 (±7,6)	41,2 (±12,9)	41,6 (±12,9)	—

DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança

*Prevalência aparente observada neste estudo

**Prevalência verdadeira estimada considerando 352 receptores de transplante renal

A distribuição da prevalência de RNA do HPgV-1 segundo faixa etária e tempo pós-transplante está apresentada na Tabela 8. Para avaliação da distribuição etária, os receptores de transplante renal foram estratificados em cinco grupos: 18–29 anos, 30–39 anos, 40–49 anos, 50–59 anos e ≥ 60 anos. As prevalências observadas foram: 18,8% no grupo de 18–29 anos, 26,6% no grupo de 30–39 anos, 28,5% no grupo de 40–49 anos, 17,2% no grupo de 50–59 anos e 7,1% no grupo ≥ 60 anos.

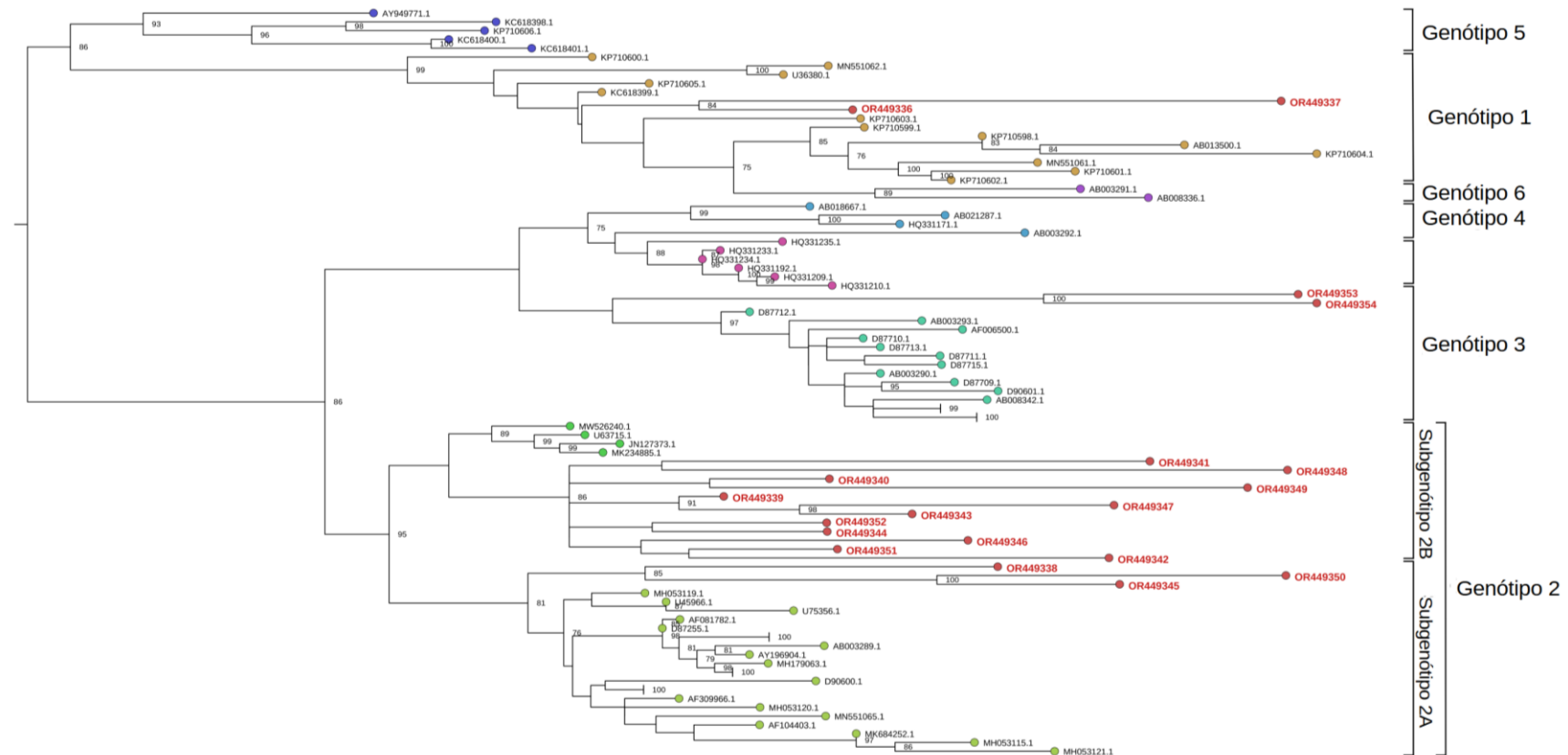
A prevalência do RNA viral também foi analisada segundo o tempo decorrido após o transplante renal, com os receptores distribuídos em cinco categorias: <1 ano, 1–3 anos, 4–6 anos, 7–9 anos e ≥ 10 anos pós-transplante. As prevalências observadas foram: 7,1% no grupo < 1 ano, 25,0% no grupo de 1–3 anos, 27,3% no grupo de 4–6 anos, 22,2% no grupo de 7–9 anos e 0,0% no grupo ≥ 10 anos pós-transplante (Tabela 8).

Tabela 8. Prevalência de RNA do HPgV-1 segundo faixa etária e tempo pós-transplante.

Prevalência de RNA do HPgV-1 por faixa etária	Resultados
18 – 29 anos	3/16 (18,8%)
30 – 39 anos	4/15 (26,6%)
40 – 49 anos	6/21 (28,5%)
50 – 59 anos	5/29 (17,2%)
≥ 60 anos	1/14 (7,1%)
Total	19/95 (20,0%)
Prevalência de RNA do HPgV-1 por tempo pós transplante	Resultados
< 1 ano	1/14 (7,1%)
1 – 3 anos	6/24 (25,0%)
4 – 6 anos	6/22 (27,3%)
7 – 9 anos	6/27 (22,2%)
≥ 10 anos	0/6 (0,0%)
Não informado	0/2 (0,0%)
Total	19/95 (20,0%)

A análise filogenética realizada demonstrou que as sequências obtidas dos 19 receptores de transplante renal da região Centro-Oeste do Brasil foram caracterizadas como HPgV-1 genótipos 1, 2 e 3. Como esperado, o genótipo predominante foi o 2, representado por 15 amostras positivas (78,9%). O genótipo 2 apresentou-se com dois subgenótipos distintos: 2A, representado por uma sequência (5,3%), e 2B, representado por 14 sequências (73,6%). Interessantemente, genótipos do HPgV-1 relatados com menor frequência no Brasil também foram identificados, sendo 2 amostras pertencentes ao genótipo 1 (10,5%) e 2 amostras ao genótipo 3 (10,5%) (Figura 6).

Figura 6. Árvore filogenética dos HPgV-1



Legenda: árvore construída a partir da análise filogenética da porção 5'UTR. O genótipo 2 foi o mais prevalente na análise.

5.4. Prevalência de CMV em Receptores de Transplante Renal

A análise metagenômica inicial identificou CMV em 12 dos 20 *pools* testados. Entretanto, a confirmação por qPCR foi viável em apenas 16 *pools*, devido à insuficiência de material biológico nos 4 *pools* restantes. Destes *pools* com volume insuficiente, um apresentou resultado negativo para CMV na metagenômica, enquanto os outros três foram positivos. Considerando a impossibilidade de validação destes resultados por metodologia confirmatória (qPCR), estes quatro *pools* foram excluídos da análise estatística final. Assim, dos 16 *pools* submetidos à confirmação, sete (43,8%) tiveram resultado positivo para CMV validado por qPCR.

Os 16 *pools* analisados representaram um total de 80 pacientes receptores de transplante renal, sendo 44 homens (55%) e 36 mulheres (45%), com idade média de 44,1 ($\pm 17,9$) anos. A estratificação por gênero demonstrou idade mediana de 47,5 ($\pm 16,5$) anos para pacientes masculinos e 42,2 ($\pm 23,3$) anos para pacientes femininos.

Ensaio de PCR quantitativa (qPCR) confirmaram 15 amostras individuais positivas para DNA de CMV, estabelecendo uma prevalência global de 18,8% ($n=15/80$) na população estudada. A análise por gênero revelou maior frequência em receptores masculinos de transplante renal [20,5% ($n=9/44$); idade média: $45,2 \pm 16,5$ anos] em comparação aos receptores femininos [16,6% ($n=6/36$); idade média: $42,2 \pm 23,3$ anos].

A avaliação estatística projetou que a prevalência real de CMV na população de receptores de transplante renal varia entre 11,2% e 26,3% (intervalo de confiança de 95%), considerando o universo total de 352 transplantes renais realizados no Hospital Universitário de Brasília até agosto de 2021 (Tabela 9).

Tabela 9. População estudada e prevalência de DNA de CMV e BKV.

Gênero	Masculino	Feminino	Total	Prevalência real estimada (IC: 95%)**
N.	44 (55%)	36 (45%)	80 (100%)	-----
Idade média (± DP)	47,5 (±16,5) ^a	42,2 (±23,3) ^a	44,1 (±17,9)	-----
CMV DNA +	9 (20,5%) ^b	6 (16,6%) ^b	15 (18,8%)*	11,2% a 26,3%
Idade média (± DP)	45,2 (±16,5) ^c	42,2 (±23,3) ^c	44,1 (±17,9) ^e	-----
CMV DNA -	35 (54%)	30 (46%)	65 (100%)	-----
Idade média (± DP)	45,8 (±12,3) ^d	44,9 (±14,8) ^d	46,5 (±13,5) ^e	-----

DP: Desvio padrão; IC: intervalo de confiança;

***Prevalência aparente observada neste estudo;**

****Prevalência real estimada considerando 352 receptores de transplante renal.**

^aTeste t de Student: p=0,1708

^bTeste exato de Fisher: p=0,777

^cTeste t de Student: p=0,8405

^dTeste t de Student: p=0,7897

^eTeste t de Student: p=0,5621

A prevalência de DNA de CMV por faixa etária e tempo após o transplante renal está detalhada na Tabela 10. Para avaliar a distribuição do DNA de CMV entre as diferentes faixas etárias, os receptores de transplante renal foram classificados em cinco grupos: 18–29 anos, 30–39 anos, 40–49 anos, 50–59 anos e acima de 60 anos. A prevalência observada apresentou uma distribuição bimodal, sendo de 30,7% no grupo de 18–29 anos, 23,0% no grupo de 30–39 anos, 20,0% no grupo de 40–49 anos, 6,9% no grupo de 50–59 anos e 30,0% no grupo acima de 60 anos, evidenciando maiores taxas de positividade nos extremos etários e menor prevalência na faixa de 50-59 anos.

A análise estratificada por tempo pós-transplante renal (pós-TxR) também foi realizada, com os receptores divididos em cinco categorias temporais: menos de 1 ano, 1–3 anos, 4–6 anos, 7–9 anos e mais de 10 anos após o transplante. Os resultados demonstraram uma tendência decrescente na prevalência de CMV com o aumento do tempo pós-transplante, sendo as

prevalências observadas de 45,45% no grupo com menos de 1 ano, 18,18% no grupo de 1–3 anos, 17,64% no grupo de 4–6 anos, 9,1% no grupo de 7–9 anos, 16,7% no grupo com mais de 10 anos após o transplante, esse aumento se deve, provavelmente, ao N pequeno de pacientes testados nesta faixa etária.

Tabela 10. Prevalência de DNA de CMV por grupos etários e tempo após transplante renal

Prevalência de DNA de CMV por grupo etário	Resultados
18 – 29 anos	4/13 (30,7%)
30 – 39 anos	3/13 (23%)
40 – 49 anos	3/15 (20%)
50 – 59 anos	2/29 (6,9%)
> 60 anos	3/10 (30%)
Total	15/80 (18,8%)
Prevalência de DNA de CMV por tempo após transplante renal	Resultados
< 1 ano	5/11 (45,45%)
1 – 3 anos	4/22 (18,18%)
4 – 6 anos	3/17 (17,64%)
7 – 9 anos	2/22 (9,1%)
> 10 anos	1/6 (16,7%)
NA: não disponível	0/2 (0%)
Total	15/80 (18,8%)

5.5. Prevalência de BKV em Receptores de Transplante Renal

Um total de 16 *pools* foram testados para BKV, destes, 3 foram positivos. No total, foram testados 80 pacientes. A análise por PCR quantitativa (qPCR) confirmou a presença de DNA viral do BKV em 3 amostras, representando uma prevalência global de 3,8% (3/80). Todos os casos positivos foram identificados em receptores do sexo masculino, resultando em uma prevalência de 6,8% (3/44) neste subgrupo específico. Considerando a população total de 352 transplantados renais no Hospital Universitário de Brasília até agosto de 2021, a prevalência real estimada de DNA de BKV situou-se entre 0,1% e a 7,4%, com intervalo de confiança de 95%.

A idade média dos pacientes positivos para BKV foi de $47,2 \pm 13,2$ anos, enquanto os pacientes negativos apresentaram média de $46 \pm 14,2$ anos. No subgrupo masculino negativo para BKV, a média de idade foi de $47,7 \pm 12,6$ anos, enquanto no subgrupo feminino negativo foi de $44,1 \pm 15,6$ anos. As análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas entre os grupos etários por gênero (teste t de Student: $p=0,1708$) ou entre os pacientes positivos e negativos para BKV. (Tabela 9).

Tabela 11. População estudada e prevalência de DNA de BKV.

Gênero	Masculino	Feminino	Total	Prevalência real estimada (IC: 95%)**
N	44 (55%)	36 (45%)	80 (100%)	-----
Age mean ($\pm$ SD)	47.5 (± 16.5) ^a	42.2 (± 23.3) ^a	44.1 (± 17.9)	-----
BKV DNA+	3 (6.8%) ^e	0 (0%) ^e	3 (3.8%)*	0.1% to 7.4%**
Age Mean ($\pm$ SD)	47.2 (± 13.21)	0 (± 0)	47.2 (± 13.2) ^h	-----
BKV DNA-	41 (53%)	36 (47%)	77 (100%)	-----
Age Mean ($\pm$ SD)	47.7 (± 12.6) ^f	44.1 (± 15.6) ^f	46 (± 14.2) ^h	-----

DP: Desvio padrão; IC: intervalo de confiança;

*Prevalência aparente observada neste estudo;

**Prevalência real estimada considerando 352 receptores de transplante renal.

^aTeste t de Student: $p=0.1708$

^bTeste exato de Fisher: $p=0.777$

^cTeste t de Student: 0.2665

^dTeste t de Student: $p=0.8860$

A distribuição dos casos positivos para BKV por faixa etária revelou prevalências de 7,7% (1/13) no grupo de 18-29 anos, 6,6% (1/15) no grupo de 40-49 anos e 3,4% (1/29) no grupo de 50-59 anos. Não foram detectados casos positivos nas faixas etárias de 30-39 anos e acima de 60 anos.

Quanto ao tempo pós-transplante, observou-se concentração significativa dos casos positivos exclusivamente no período de 1-3 anos após o procedimento, com prevalência de 13,6% (3/22) neste grupo específico. Não foram identificados casos positivos nos demais intervalos temporais analisados (<1 ano, 4-6 anos, 7-9 anos e >10 anos pós-transplante) (Tabela 10).

Tabela 12. Prevalência de DNA de BKV por grupos etários e tempo após transplante renal

Prevalência de DNA de BKV por grupo etário	Resultados
18 – 29 anos	1/13 (7,7%)
30 – 39 anos	0/13 (0,0%)
40 – 49 anos	1/15 (6,6%)
50 – 59 anos	1/29 (3,4%)
> 60 anos	0/10 (0,0%)
Total	3/80 (3,8%)
Prevalência de DNA de BKV por tempo após transplante renal	Resultados
< 1 ano	0/11 (0,0%)
1 – 3 anos	3/22 (13,6%)
4 – 6 anos	0/17 (0,0%)
7 – 9 anos	0/22 (0,0%)
> 10 anos	0/6 (0,0%)
Total	3/80 (3,8%)

5.6. Prevalência de EBV em Receptores de Transplante Renal

A análise metagenômica de 20 *pools* amostrais identificou positividade para o vírus Epstein-Barr (EBV) em 4 *pools* (20%), todos caracterizados por baixa quantidade de *reads*, média de 13,1 *reads* por *pool* positivo. Devido às limitações de volume amostral, o estudo prosseguiu com a testagem de 19 *pools*, submetendo-os à confirmação por qPCR.

Entre os quatro *pools* positivos na triagem metagenômica, apenas dois foram confirmados por qPCR, sendo que um destes, continha dois pacientes com EBV detectável. Os outros dois *pools* positivos na metagenômica não tiveram confirmação por qPCR, destacando-se que estes apresentaram baixíssima quantidade de *reads* na metagenômica (5 e 6 *reads*). Adicionalmente, observou-se um caso de *pool* negativo na abordagem metagenômica que apresentou um paciente positivo quando avaliado por qPCR. Para fins de análise estatística epidemiológica, foram considerados válidos apenas os resultados concordantes entre as duas metodologias.

A análise molecular das 95 amostras revelou uma prevalência de 3,15% (n=3/95) para DNA do vírus Epstein-Barr (EBV) na população estudada, com idade média dos indivíduos infectados de 49,3 ± 16,1 anos.

Observou-se distribuição assimétrica entre os gêneros, com maior prevalência em receptores do sexo feminino (4,87%; n=2/41; idade média $40,0 \pm 1,4$ anos) em comparação aos do sexo masculino (1,85%; n=1/54; idade média 68,0 anos). A análise estatística inferencial, considerando o universo total de 352 pacientes transplantados renais atendidos no Hospital Universitário de Brasília até agosto de 2021, estimou uma prevalência verdadeira populacional situada entre 0,01% e 6,7%, com intervalo de confiança de 95% (Tabela 13).

Tabela 13. População estudada e prevalência de DNA do EBV.

Características	Masculino	Feminino	Total	Prevalência verdadeira estimada (IC 95%)
N (%)	54 (56,8%)	41 (43,2%)	95 (100%)	—
Idade média ($\pm$ DP)	47,5 ($\pm$ 12,6)	43,2 ($\pm$ 15,4)	45,3 ($\pm$ 14,1)	—
EBV DNA +	1 (1,85%)	2 (4,87%)	3 (3,15%)*	0,01% a 6,7%**
Idade média ($\pm$ DP) dos positivos	68 ($\pm$ 0,0)	40 ($\pm$ 1,4)	49 ($\pm$ 16,1)	—

DP: Desvio padrão; IC: Intervalo de confiança

*Prevalência aparente observada neste estudo

**Prevalência verdadeira estimada considerando 352 receptores de transplante renal

A estratificação da prevalência de DNA do EBV segundo faixas etárias, distribuídas em cinco categorias (18–29 anos, 30–39 anos, 40–49 anos, 50–59 anos e ≥ 60 anos), evidenciou um padrão heterogêneo de distribuição. As taxas de positividade foram observadas nos grupos de idade mais avançada, com prevalências de 6,6% no estrato de 30–39 anos, 4,76% na faixa de 40–49 anos e 7,14% no grupo ≥ 60 anos. Não foram detectadas amostras positivas nos grupos de 18–29 anos e 50–59 anos.

Quanto à análise temporal relacionada ao período pós-transplante, os receptores foram categorizados em cinco intervalos: <1 ano, 1–3 anos, 4–6 anos, 7–9 anos e ≥ 10 anos pós-procedimento. A distribuição da infecção/reativação viral mostrou-se concentrada no período inicial pós-transplante, com prevalências de 7,1% no grupo <1 ano e 8,3% no estrato de 1–3 anos. Não foi detectada presença de DNA viral nos grupos com maior tempo decorrido após o transplante (4–6 anos, 7–9 anos e ≥ 10 anos), sugerindo possível associação entre a infecção/reativação viral e o período de

imunossupressão mais intensa que caracteriza a fase inicial pós-transplante (Tabela 14).

Tabela 14. Prevalência de DNA do EBV segundo faixa etária e tempo pós-transplante.

Prevalência de DNA do EBV por faixa etária	Resultados
18 – 29 anos	0/16 (0,0%)
30 – 39 anos	1/15 (6,6%)
40 – 49 anos	1/21 (4,76%)
50 – 59 anos	0/29 (0,0%)
≥ 60 anos	1/14 (7,14%)
Total	19/95 (20,0%)
Prevalência de DNA do EBV por tempo pós-transplante	Resultados
< 1 ano	1/14 (7,1%)
1 – 3 anos	2/24 (8,3%)
4 – 6 anos	0/22 (0,0%)
7 – 9 anos	0/27 (0,0%)
≥ 10 anos	0/6 (0,0%)
Não informado	0/2 (0,0%)
Total	3/95 (3,15%)

5.7. Ausência de Detecção de HHV-6 em Receptores de Transplante Renal

A análise metagenômica dos 20 *pools* amostrais não identificou sequências genômicas compatíveis com o Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) em nenhuma das amostras avaliadas. Para validação deste resultado negativo e exclusão de possíveis limitações metodológicas da abordagem metagenômica, todas as 100 amostras individuais foram subsequentemente submetidas à amplificação por PCR quantitativa (qPCR), metodologia considerada padrão-ouro para detecção viral específica.

A avaliação por qPCR confirmou a ausência completa de DNA do HHV-6 em todas as amostras testadas, corroborando os achados negativos obtidos pela abordagem metagenômica inicial. Esta concordância absoluta entre as duas metodologias independentes valida os resultados negativos e confirma a ausência de circulação detectável deste agente viral na população de receptores de transplante renal estudada durante o período de investigação.

5.8. Ausência de Detecção de VZV em Receptores de Transplante Renal

Em 4 pools dos 20 pools testados pela metagenômica, foram encontradas leituras entre 8 e 35 *reads* para a presença de Varicellovirus. O vírus pertencente este gênero, capaz de causar doença em seres humanos é o herpesvírus humano 3 (HHV-3), também conhecido como varicela-zoster (VZV). Apesar de duas tentativas de amplificação por qPCR, utilizando *kits* comerciais distintos, não foi possível detectar a presença do vírus por este último método.

5.9. Síntese dos achados por NGS e qPCR

A Tabela 15 sintetiza os principais achados, por *pool*, detectados por meio da metagenômica viral e confirmados por qPCR.

Tabela 15. Quantidade de *Reads* detectadas por NGS e resultado da contraprova por qPCR

Pool	Total de <i>reads</i> após filtragem dos dados	<i>Reads</i> TTV	<i>Reads</i> HPgV-1	<i>Reads</i> BKV	<i>Reads</i> CMV	<i>Reads</i> VZV	<i>Reads</i> EBV	Detectado por qPCR
1	5.809.566	1.389.123	2.434.674	-	15	20*	-	HPgV-1 e CMV
2	337.987	132.302	4.962 ^{NT}	368	8	-	6*	HPgV-1, BKV e CMV
3	223.369	103.462	111.838	-	5	8*	-	HPgV-1 e CMV
4	169.466	35.915	125.364	-	5	-	-	HPgV-1 e CMV
5	174.528	162.441	1.425	-	26	-	-	HPgV-1 e CMV
6	65.967	13.338	40.812	- ^{NT}	14 ^{NT}	- ^{NT}	-	HPgV-1
7	21.785	2.289	-	-	22	15*	-	CMV
8	1.268.212	790.868	442.482	- ^{NT}	5 ^{NT}	- ^{NT}	8	HPgV-1 e EBV
9	3.603	484	60	-	-	-	5	HPgV-1 e EBV
10	2.536.352	2.512.359	18.276	3.450	7	-	-	HPgV-1, BKV e CMV
11	1.101.224	1.097.832	993	-	17	-	5*	HPgV-1 e CMV
12	121.948	221	118.969	-	-	-	-	HPgV-1
13	561.621	555.197	5.204	- ^{NT}	8 ^{NT}	- ^{NT}	- ^{NT}	HPgV-1
14	559.195	489.784	64.440	-	92	-	-	HPgV-1 e CMV
15	6.380	4.288	-	- ^{NT}	- ^{NT}	- ^{NT}	-	-
16	388.311	384.256	-	-	-	-	-	-
17	210.900	2.754	198.450	6.340	5	-	-	HPgV-1, BKV e CMV
18	9.214	7.364	-	-	12	-	-	CMV
19	8.185	710	-	-	-	-	-	-
20	210.900	3.012	91	-	7	35*	-	HPgV-1, CMV e EBV**

Legenda: * - Detectado por NGS e negativo por qPCR; ** - Não detectado por NGS e positivo por PCR; NT - não testado

6. DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, o sequenciamento e a metagenômica têm sido utilizados em larga escala para maior entendimento da interação entre o organismo humano e os microrganismos que compõem sua microbiota. Avanços na área têm demonstrado que a composição da microbiota, a presença ou ausência de um dado agente, além do volume que este representa dentro do organismo, pode determinar alterações fisiológicas e/ou predisposições patológicas.^{45, 46, 48, 49, 50, 54, 55} Além disso, para a microbiologia, o método tem facilitado a identificação de novos agentes e novas variantes, uma vez que os dados gerados pelo sequenciamento em metagenômica fazem uma detecção global ao invés de uma pesquisa direcionada a alvos específicos.^{54, 55, 58, 59, 60}

Apesar dos avanços alcançados com o uso da metagenômica, existe uma necessidade crescente no sentido de estabelecer protocolos e pipelines de bioinformática que sejam capazes de amenizar ou normalizar as variações que têm sido encontradas nos resultados dos estudos. A padronização de protocolos é um desafio central na metagenômica clínica. A variabilidade nos resultados pode ser atribuída a múltiplos fatores, incluindo o método de extração de ácido nucleico, a escolha de kits para construção de bibliotecas de sequenciamento e a profundidade do sequenciamento. Estudos comparativos demonstraram que diferentes protocolos de extração podem favorecer a detecção de certos tipos de vírus (DNA ou RNA, envelopados ou não envelopados), introduzindo um viés significativo na representação do viroma. Além disso, a etapa de amplificação, necessária em muitas abordagens de metagenômica viral, pode distorcer a abundância relativa dos vírus presentes na amostra original, um fenômeno conhecido como "viés de amplificação". Esses desafios ressaltam a importância de incluir controles internos e desenvolver pipelines de bioinformática robustos que possam normalizar essas variações técnicas para permitir comparações mais acuradas entre diferentes estudos.^{77, 78, 79, 80, 81}

Em nossos experimentos, observamos que a utilização de *pools* se mostra como uma estratégia que possibilita a testagem de um volume maior de amostras a um custo um pouco inferior. Contudo, como observado na testagem de EBV, a utilização desse método pode induzir o surgimento de resultados falso-negativos devido à diluição das amostras contidas em um mesmo *pool*. As limitações da utilização de *pools* em metagenômica viral estão bem documentadas na literatura científica. O efeito de diluição por material de indivíduos negativos inerente ao *pooling* de amostras pode resultar em redução significativa da sensibilidade diagnóstica, especialmente para patógenos presentes em baixas cargas virais.⁸² Em análises de RT-PCR, foi observado que *pools* de 10 amostras apresentaram taxa de falsos negativos de 9% para amostras com baixa carga viral ($Ct \geq 31$), enquanto *pools* menores (4-8 amostras) mantiveram sensibilidade superior a 98%.⁸³ Adicionalmente, o *pooling* em sequenciamento nanopore pode resultar em contaminação cruzada quando amostras de baixo e alto título são combinadas, comprometendo a acurácia dos resultados.⁸⁴ Esses achados corroboram nossas observações de que a estratégia de *pooling*, embora economicamente vantajosa, pode mascarar a detecção de vírus em baixa carga, como observado com o EBV em nosso estudo.

A presença de anticorpos contra EBV na população sadia tem uma taxa de prevalência que gira entre 60 e 90%.^{76, 85} Estudos recentes demonstraram prevalências de 11,7%⁷⁵ e 20%⁷⁶ para viremia em pacientes transplantados renais. O vírus é amplamente conhecido por causar proliferação descontrolada de células B em pacientes transplantados, bem como o quadro de doença linfoproliferativa pós-transplante. Contudo, os pacientes transplantados renais são os menos susceptíveis a esses quadros (1 a 3%) quando comparados a transplantados de outros órgãos sólidos.^{86, 87, 88}

A principal complicação associada ao EBV, a Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante (PTLD), é um resultado direto da perda do controle imunológico sobre as células B infectadas. Durante a latência, proteínas virais como a Proteína de Membrana Latente 1 (LMP1) e LMP2A mimetizam sinais de receptores de células B (como o CD40 e o BCR, respectivamente),

promovendo a proliferação e a sobrevivência celular de forma independente de estímulos externos. A LMP1, em particular, ativa vias de sinalização cruciais como a NF- κ B, JNK e p38 MAPK, centrais para o crescimento e a prevenção da apoptose. Em um indivíduo imunocompetente, as células T citotóxicas específicas para esses antígenos latentes eliminam eficientemente as células B em proliferação. Nos pacientes transplantados, a imunossupressão farmacológica abole essa vigilância, permitindo a expansão clonal descontrolada que caracteriza a PTLN. A baixa incidência em transplantados renais (1-3%) comparada a outros órgãos pode ser parcialmente atribuída a regimes de imunossupressão tipicamente menos intensos.^{89, 90}

A taxa de prevalência para EBV encontrada em nosso estudo, está em relativamente abaixo daquela descrita na literatura para esta população, para pacientes transplantados renais, para este achado é importante destacar que o sequenciamento de nova geração (NGS) e o qPCR apresentam limites de detecção distintos. Estudos prévios demonstraram que a prevalência de DNA de EBV detectável no sangue de receptores de transplante renal varia significativamente, com taxas de 18,4% no primeiro ano pós-transplante, aumentando progressivamente com o tempo desde o transplante.^{91, 92} A variabilidade na prevalência reportada pode ser atribuída às diferentes metodologias de detecção empregadas e aos critérios de positividade adotados. Enquanto o NGS pode detectar fragmentos virais em quantidades extremamente reduzidas, como evidenciado pela baixa contagem de *reads* (5-6 *reads*) nos *pools* discordantes, o qPCR requer um limiar mínimo de cópias virais para amplificação detectável, geralmente entre 10-100 cópias/mL, dependendo do protocolo.⁹³ Estudos comparativos demonstraram que a metagenômica pode alcançar limites de detecção de 14-191 cópias/mL para diferentes vírus, com sensibilidade de 93,6% e especificidade de 93,8%, apresentando correlação adequada com qPCR, embora com diferenças inter-métodos variando de 0,19 log₁₀ IU/mL para EBV.^{93, 94}

Além disso, em receptores de transplante renal sob imunossupressão, o EBV pode apresentar-se em estado de replicação parcial ou reativação

limitada, gerando fragmentos genômicos incompletos. A reativação do EBV em pacientes imunossuprimidos frequentemente resulta em ciclos de replicação abortivos ou incompletos, onde apenas genes imediatos-precoces (BZLF1 e BRLF1) são expressos sem progressão para a fase lítica completa.⁹⁵ Este fenômeno de reativação parcial é particularmente comum em transplantados, onde a imunossupressão permite a expressão de genes virais iniciais, mas não necessariamente a replicação viral completa.⁹⁶ Tais fragmentos podem ser sequenciáveis pela abordagem metagenômica, mas insuficientes para amplificação completa pelos *primers* específicos do qPCR, especialmente se a fragmentação ocorrer nas regiões-alvo dos *primers*. A natureza independente de sequência da metagenômica permite a detecção de genomas virais fragmentados ou parcialmente replicados, incluindo sequências de genes precoces e tardios que podem estar presentes em diferentes proporções durante estados de reativação incompleta.^{97, 98} A metagenômica, por sua abordagem independente de sequência, pode identificar estas variantes, explicando resultados positivos por NGS e negativos por qPCR. Este fenômeno é particularmente relevante considerando que a reativação do EBV em transplantados pode ocorrer de forma heterogênea, com diferentes células apresentando diferentes estágios do ciclo viral, desde latência até replicação lítica parcial ou completa.^{99, 100}

Por outro lado, o caso em que o qPCR identificou EBV em uma amostra negativa na metagenômica pode ser explicado pela natureza aleatória da amostragem em sequenciamento de baixa profundidade, onde a detecção de patógenos em baixa abundância depende da probabilidade de captura durante a preparação da biblioteca genômica. Em amostras com patógenos de baixa abundância (como neste caso), o processo de captura, amplificação e sequenciamento de fragmentos genômicos segue princípios probabilísticos. Quando a concentração viral é extremamente baixa (próxima ao limite de detecção técnica), cada etapa do processo metagenômico – desde a extração do material genético, fragmentação, ligação de adaptadores, amplificação e sequenciamento – está sujeita a variações aleatórias. Este fenômeno é comparável a um processo de amostragem ao acaso de uma população muito

pequena, onde a probabilidade de capturar representantes desta população diminui drasticamente com sua escassez.¹⁰¹ A detecção de patógenos em baixa abundância na metagenômica segue um processo estocástico descrito pelo modelo de Bernoulli, onde a probabilidade de detecção de pelo menos uma sequência viral depende da razão vírus-*background* da amostra e do tamanho do *dataset* sequenciado.¹⁰¹ Estudos demonstraram que a amplificação aleatória introduz viés sistemático e variabilidade estocástica, especialmente em amostras com baixa carga viral, onde eventos aleatórios locais durante o sequenciamento podem afetar significativamente a qualidade e a representatividade dos dados obtidos.^{102, 103} Adicionalmente, a detecção de organismos em abundância extremamente baixa (0,00001%) requer profundidade de sequenciamento massiva e está sujeita a limitações estocásticas inerentes ao processo de amostragem genômica.¹⁰⁴ Esses achados corroboram nossa observação de discordância entre qPCR e metagenômica para EBV, evidenciando que a natureza probabilística da captura de fragmentos virais em baixa abundância pode resultar em falsos negativos na análise metagenômica, mesmo quando o patógeno está presente em níveis detectáveis por métodos mais sensíveis como qPCR.

Em nosso estudo, a estratificação da prevalência de DNA do EBV segundo faixas etárias, evidenciou um padrão heterogêneo de distribuição. Este padrão de distribuição etária apresenta características distintas daquelas tradicionalmente descritas na literatura, onde a idade jovem é frequentemente associada a maior risco de infecção primária por EBV e desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD).^{99, 105} A ausência de detecção viral no grupo mais jovem (18-29 anos) pode refletir tanto a menor prevalência de soropositividade pré-transplante nesta faixa etária quanto possíveis diferenças na intensidade da imunossupressão ou na resposta imune residual.¹⁰⁶ Paradoxalmente, estudos recentes demonstraram que pacientes mais velhos (≥ 60 anos) apresentam maior susceptibilidade à reativação viral devido ao declínio da imunocompetência relacionado à idade, fenômeno conhecido como imunossenescência.^{107, 108} Contudo, devido ao nosso número amostral e as discrepâncias observadas na detecção deste patógeno, nossos

resultados não podem ser utilizados para fins de análise estatísticas no caso deste patógeno.

Quanto à análise temporal relacionada ao período pós-transplante, a detecção do DNA viral mostrou-se concentrada no período inicial pós-transplante. Estes achados estão em consonância com dados da literatura que demonstram que a maioria das reativações de EBV (91%) ocorre nos primeiros 6 meses pós-transplante, com pico de incidência nos primeiros 3 meses (49% no primeiro mês e 35% entre 1-3 meses).¹⁰⁹ A concentração temporal observada no presente estudo corrobora o conceito de que a reativação viral está intimamente relacionada à intensidade da imunossupressão, que é tipicamente mais elevada no período inicial para prevenir rejeição aguda, criando um ambiente propício para a replicação viral.¹¹⁰ Estudos prospectivos demonstraram que o tempo mediano para detecção de viremia por EBV é de 83 dias (intervalo interquartil: 50-130 dias) pós-transplante, com 49% dos receptores desenvolvendo DNAemia no primeiro ano.¹¹¹ A ausência de detecção viral nos períodos tardios pode refletir tanto a redução progressiva da imunossupressão ao longo do tempo quanto o desenvolvimento de tolerância imunológica parcial, permitindo melhor controle da replicação viral pela imunidade celular residual.⁹² Adicionalmente, a distribuição temporal observada em diversos estudos, sugere que protocolos de monitoramento viral devem ser intensificados nos primeiros três anos pós-transplante, período de maior vulnerabilidade, com possível relaxamento da vigilância em períodos mais tardios, desde que não haja fatores de risco adicionais.^{112, 113}

Neste estudo, a análise metagenômica identificou outros agentes virais clinicamente significativos, incluindo o citomegalovírus (CMV) e o vírus BK (BKV). A presença destes vírus foi posteriormente confirmada por qPCR.

Nosso estudo encontrou uma prevalência global de DNA de CMV de 18,8%, com uma prevalência verdadeira estimada variando de 11,2% a 26,3%. Esta prevalência está dentro da faixa relatada por outros estudos que examinaram o CMV em transplantados renais em todo o mundo. Prevalências mais altas de DNA de CMV foram relatadas na Coreia (36,3%)¹¹⁴, Irã

(37,5%)¹¹⁵ e Polônia (34,2%)¹¹⁶, enquanto uma prevalência mais baixa foi observada no Líbano (5,9%). A variação na prevalência de DNA de CMV entre os estudos pode ser atribuída as diferenças nos níveis de imunossupressão nos pacientes testados, tempo após o transplante, *status* sorológico de CMV do doador e receptor, e tipo de órgão transplantado¹¹⁷. Por exemplo, a terapia de indução com globulina anti-tímócito (ATG) aumenta significativamente o risco de infecção por CMV em Receptores de Transplante renal (RTRs), particularmente na ausência de profilaxia antiviral ou em altas doses de ATG^{118, 119}. Em contraste, inibidores de alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) como sirolimus (SIR) e everolimus (ERL) reduzem significativamente a incidência de reativação de CMV em comparação com regime padrão, baseados em inibidores de calcineurina (CNI)¹²⁰. Em relação ao *status* sorológico do doador (D) e receptor (R), o risco de infecção por CMV é notavelmente maior nas combinações D+/R- e D+/R+¹.

Além dos seus efeitos citopáticos diretos nos tecidos, o vírus orchestra uma sofisticada estratégia de evasão imune e imunomodulação, cujos "efeitos indiretos" são frequentemente mais deletérios a longo prazo. O CMV desenvolveu múltiplos mecanismos para interferir na apresentação de antígenos às células T. As proteínas virais US2, US3, US6 e US11, por exemplo, atuam em conjunto para impedir que peptídeos virais sejam carregados em moléculas de MHC de classe I e apresentados na superfície celular. A proteína US6 bloqueia o transportador associado ao processamento de antígenos (TAP), impedindo a entrada de peptídeos no retículo endoplasmático, enquanto a US3 retém as moléculas de MHC no retículo, e a US2 e US11 as marcam para degradação no proteassoma. Ao fazer isso, o CMV torna as células infectadas "invisíveis" para as células T CD8+ citotóxicas, garantindo sua persistência.^{121, 122}

Este estudo também avaliou a prevalência de infecção por CMV por idade do receptor. A comparação da distribuição etária entre receptores positivos e negativos para DNA de CMV não mostrou diferença significativa. Entre os receptores positivos para DNA de CMV, a prevalência atingiu o pico naqueles com idade entre 18 e 29 anos; diminuiu progressivamente com o

aumento da idade, atingindo os níveis mais baixos nos grupos de meia-idade; e aumentou em receptores com mais de 60 anos. Embora alguns estudos mostrem que a idade avançada está associada ao aumento do risco de infecção por CMV, nossos resultados sugerem uma relação em forma de U.
123, 124, 125, 126, 127, 128

A prevalência de DNA de CMV encontrada foi mais alta no primeiro ano pós-transplante renal (60%). Dado que nosso estudo representa um desenho transversal, a prevalência real pode estar subestimada, pois pacientes avaliados em momentos posteriores podem ter testado positivo anteriormente. Na ausência de intervenções profiláticas, a infecção por CMV ocorre em aproximadamente 40% a 100% dos receptores de transplante renal. As estratégias de prevenção atuais reduzem a incidência para aproximadamente 17% a 37%, com o pico de risco observado nos primeiros 100 dias pós-transplante.¹²⁹

A metagenômica viral também identificou *reads* de BKV no plasma destes pacientes. A soroprevalência global do BKV é universalmente alta, afetando 65% a 90% em diversas populações.¹³⁰ A infecção primária por BKV ocorre durante a infância e persiste na forma latente no trato urinário. A reativação ocorre durante a imunossupressão, resultando em eliminação viral detectável na urina, mas em casos mais graves, o BKV pode estar relacionado à viremia.¹³¹ A infecção por BKV em aloenxertos renais pode levar à nefropatia associada ao BKV (NABKV) e, conseqüentemente, à rejeição do aloenxerto.
132

Este estudo encontrou DNA de BKV em 3,8% (prevalência verdadeira estimada: 0,1%-7,4%) das amostras de plasma de RTRs. Como observado para o CMV, este estudo transversal pode subestimar a prevalência real de viremia por BKV. A prevalência relatada de viremia por BK em RTRs varia amplamente entre os estudos (3% a 40%), devido a diferenças na população e metodologias diagnósticas.^{133, 134} A presença de DNA de BKV no sangue de receptores de transplante é considerada um marcador importante devido a potenciais danos no órgão transplantado. Acredita-se que o aparecimento de BKV no sangue representa a capacidade do vírus de atravessar a barreira

hemato-renal devido a extravasamentos de vírus de dentro do órgão, e assim a viremia por BKV pode estar associada à função comprometida do órgão.¹³⁵

No entanto, é importante reconhecer que não sabíamos a forma do DNA de BKV circulante, se era um vírus infeccioso ou material genético não infeccioso, para tirar conclusões robustas. Além disso, nosso estudo não foi prospectivo para observar variações nas cargas virais dos limiares de ciclo. No entanto, considerando os limiares de ciclo das amostras amplificadas (CTs 35,8, 24,4 e 22,8), podemos sugerir uma infecção ativa e consequentemente, indicar um monitoramento mais próximo dos pacientes afetados. Conforme as diretrizes da *American Society of Transplantation–Infectious Diseases Community of Practice (AST-IDCOP)*, os níveis de DNA de BKV no plasma devem ser monitorados mensalmente durante os primeiros nove meses pós-transplante, depois a cada três meses até dois anos, e anualmente a partir daí até cinco anos.¹³⁶ Em nosso estudo, os três receptores que testaram positivo para DNA de BKV estavam no período de 1 a 3 anos pós-transplante; no entanto, considerando a dinâmica viral relatada na literatura, sugerimos que esses pacientes apresentaram resultado positivo para BK mais cedo, sem possibilidade de atingir a eliminação viral no momento do teste.

A principal estratégia de manejo para a viremia por BKV e NABKV é a redução da imunossupressão. Tipicamente, isso envolve a diminuição ou descontinuação do agente antimetabólito (como micofenolato) e, se necessário, a redução do inibidor de calcineurina. Esta abordagem visa restaurar a resposta imune específica contra o BKV, permitindo o controle da replicação viral. No entanto, essa modulação deve ser cuidadosamente balanceada, pois a redução excessiva da imunossupressão aumenta o risco de rejeição do enxerto, destacando o delicado equilíbrio que os clínicos devem manter no manejo desses pacientes.¹³⁶

O número limitado de casos positivos para DNA de BKV entre nossos receptores (apenas três amostras) impede tirar conclusões definitivas sobre a associação entre a idade do receptor e a infecção por BKV. A idade do receptor é um fator de risco conhecido para positividade de DNA de BKV, mostrando maior prevalência em indivíduos mais velhos.^{137, 138, 139}

Diversos estudos têm acompanhado o impacto da presença do HPgV-1 e o desfecho dos pacientes.^{140, 141, 142, 143} Em estudo conduzido por Izumi e colaboradores, foi possível observar relação entre a presença do HPgV-1 e a alteração da regulação gênica dos linfócitos dos pacientes infectados com o vírus, especialmente nos genes induzidos por interferon.¹⁴³

De forma interessante, um estudo de Thijssen e colaboradores associou a infecção por HPgV-1 com um bom prognóstico para pacientes transplantados hepáticos, assim como é defendido na coinfeção com HIV.⁸⁵ Naquele estudo, os pesquisadores observaram que os pacientes que apresentavam viremia para HPgV-1 continuavam vivos após 5 anos, ou mais, de transplante.¹⁴⁴ No presente estudo, entre os 19 pacientes com viremia para HPgV-1, 95% tinham menos de 60 anos, entre este grupo, 63% tem ao menos 4 anos transplante.

A prevalência geral de RNA, desta partícula viral, encontrada em nosso estudo foi de 20% (prevalência verdadeira estimada entre 13,1% e 26,9%). Poucos estudos avaliaram a prevalência de RNA de HPgV-1 entre receptores de transplante renal no Brasil. Contudo, a prevalência que encontramos está alinhada com a observada em outros estudos brasileiros com o mesmo tipo de população, como no Centro-Oeste do Brasil (cidade de Goiânia), onde a prevalência detectada foi de 16,7%¹⁴⁵ e no Rio de Janeiro (sudeste do Brasil), relatando uma prevalência muito alta de RNA de HPgV-1 de 36,1%¹⁴⁶. Prevalências mais altas foram observadas na Turquia (42%)¹⁴⁷ e na Índia (52,9%) [23], e prevalências semelhantes foram observadas na Itália (24%)¹⁴⁰ e na Espanha (26,1%)¹⁴⁸ em comparação com o presente estudo. Acreditamos que as diferenças na prevalência de HPgV-1 podem ser explicadas por variações epidemiológicas (tamanho e características clínicas dos pacientes), rotas de transmissão, nível de imunossupressão, hábitos de vida e sensibilidade dos métodos de detecção.^{145, 149}

O HPgV-1 tem sido consistentemente associado a um melhor prognóstico em coinfeções, notavelmente com o HIV-1, e dados emergentes sugerem um efeito semelhante em transplantados. O mecanismo por trás desse benefício parece residir em sua capacidade de induzir um estado anti-

inflamatório. A proteína E2 do HPgV-1, por exemplo, demonstrou inibir a ativação do NF-κB e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a infecção por HPgV-1 parece modular a resposta ao interferon, mantendo a sinalização de genes estimulados por interferon (ISGs) em um nível basal mais baixo, o que poderia atenuar a inflamação crônica prejudicial sem comprometer completamente a resposta antiviral. Em um paciente transplantado, essa modulação sutil poderia diminuir a alo-reatividade e o risco de rejeição, explicando as associações com melhor sobrevida do enxerto observadas em alguns estudos.^{150, 151}

Em pacientes transplantados, a imunossupressão medicamentosa é essencial para prevenir a rejeição do enxerto, mas também aumenta o risco de infecções oportunistas. A presença do HPgV-1 poderia, teoricamente, modular este equilíbrio imunológico delicado. Estudos demonstraram que o HPgV-1 pode inibir a função de células NK dependente de IL-12 e alterar a produção de diversas citocinas, incluindo IL-4, IL-2 e IL-17A.¹⁵¹ Estas alterações podem ter implicações significativas para receptores de transplante renal, afetando potencialmente a resposta imune contra patógenos e a rejeição do órgão transplantado.

Por outro lado, estudos que examinam a prevalência de HPgV-1 em outros grupos de estudo mostraram valores mais baixos. Por exemplo, estudos brasileiros que investigaram a prevalência de HPgV-1 entre doadores de sangue saudáveis mostraram prevalência, que variou entre 4,2% e 10%.^{71, 152, 153, 154, 156} Em geral, as taxas de prevalência mais altas entre receptores de transplante renal são esperadas devido a duas razões principais: (i) altos níveis de exposição parenteral, como hemodiálise prévia, e (ii) os níveis de imunossupressão medicamentosa nestes pacientes, indispensável para mantê-los as características funcionais do rim transplantado ao longo da vida. Nesse sentido, estudos realizados na América do Sul mostraram taxas de prevalência de RNA de HPgV-1 variando entre 12,8% e 17,6% em pacientes submetidos à hemodiálise.^{145, 157, 158, 159}

Também observamos um aumento gradual da prevalência de RNA de HPgV-1, que começou com 21,4% nas faixas etárias de 18-29 anos e atingiu

o pico no grupo de 40-49 anos (28,5%), com uma diminuição gradual no grupo de 50-59 anos (17,2%) e > 60 anos (7,1%). Esses resultados são semelhantes aos estudos brasileiros, especialmente aqueles que investigam doadores de sangue 71,133 [15, 32]. Embora os autores indiquem que a atividade sexual influencia essa distribuição etária da prevalência para doadores de sangue saudáveis, essa conclusão não pode ser aplicada claramente para receptores de transplante renal devido à maior possibilidade de transmissão parenteral. Isso é fortalecido pela evidência de que receptores positivos para RNA de HPgV-1 têm maiores requisitos de transfusão intraoperatória e aumento do número de transfusões pré-transplante em comparação com receptores negativos para RNA de HPgV-1.¹⁴⁸

Um estudo de avaliação da cinética da infecção por HPgV-1 demonstrou que a taxa de infecção por HPgV-1 aumentou de 14,7% no pré-transplante para 19,1% no primeiro ano pós-transplante.¹⁴⁸ Aqui, observamos que a taxa de prevalência de RNA de HPgV-1 aumentou de 7,1% em pacientes com > 1 ano pós-transplante para 25% em pacientes com 1-3 anos pós-transplante. A taxa de prevalência permanece mais alta em pacientes com 4-6 anos (27,3%) e 7-9 anos pós-transplante (22,2%), diminuindo após 10 anos. Não sabemos se o RNA de HPgV-1 já estava presente nos pacientes antes do transplante e, portanto, é impossível determinar se os respectivos pacientes tiveram uma infecção prévia por HPgV-1. No entanto, o aumento da prevalência dentro do período pós-transplante pode ser resultado de infecção advinda do órgão transplantado, hemocomponentes recebidos ou a presença de infecções decorrentes da manutenção da terapia imunossupressora. Os métodos de detecção atuais podem não ser eficazes na detecção de uma infecção por HPgV-1 com baixos níveis de replicação,¹⁶⁰ e a prevalência no primeiro ano pós-transplante pode ser maior do que o observado.

A análise filogenética realizada mostrou a presença de três genótipos de HPgV-1 (genótipos 1, 2 e 3). O genótipo 2 foi o mais frequentemente detectado (15/19, 78%), com 1 espécime pertencente ao subgenótipo 2A (5,3%) e 14 sequências pertencentes ao subgenótipo 2B (73,6%). Esses resultados eram esperados, uma vez que o genótipo 2 é o genótipo de HPgV-

1 mais frequentemente detectado no Brasil em diferentes grupos de pacientes, como indivíduos infectados pelo HIV-1,^{145, 156, 161} doadores de sangue saudáveis,^{71, 152, 162, 163, 164} receptores de transplante renal^{145, 165} e pacientes com hepatite fulminante.¹⁶⁵ Além disso, o genótipo 2 de HPgV-1 é o mais prevalente em países europeus e nos EUA.^{166, 167}

Em percentuais mais baixos, também detectamos os genótipos 1 e 3, com 2 espécimes pertencentes ao genótipo 1 e 2 espécimes pertencentes ao genótipo 3. O genótipo 1 é identificado predominantemente na África,^{168, 169} enquanto o genótipo 3 é endêmico para populações asiáticas e índio-americanas.^{170, 171} Alguns estudos brasileiros também detectaram, com menor prevalência, os genótipos 1 e 3 de HPgV-1 entre doadores de sangue,⁷¹ indivíduos infectados pelo HIV-1¹⁵⁶ e receptores de transplante renal.^{145, 165} Acreditamos que a presença de genótipos de HPgV-1 como 1 e 3 (raros para o Brasil) pode estar relacionada à miscigenação do país, onde estão presentes descendentes de origem africana e índio-americana.

Nossos dados, alinhados com a literatura recente, destacam que pacientes submetidos à hemodiálise e receptores de transplante renal estão em maior risco de infecção por HPgV-1 comparados à população geral. Um estudo recente com pacientes em hemodiálise no Irã encontrou uma prevalência de 13,6% de HPgV-1, significativamente maior que os 0,6% observados em controles saudáveis, reforçando a importância das vias de transmissão parenteral.¹⁷²

Fatores como duração prolongada da diálise, níveis elevados de ureia e idade avançada foram significativamente associados à positividade para HPgV-1. Estes achados enfatizam a hemodiálise como um fator de risco importante para a transmissão de HPgV-1, provavelmente exacerbado por práticas hospitalares em unidades de diálise. É crucial implementar medidas rigorosas de controle de infecção em ambientes de diálise e transplante para mitigar a transmissão viral.

Embora o HPgV-1 seja geralmente considerado não-patogênico, seu potencial papel imunomodulador levanta questões importantes sobre suas implicações clínicas em receptores de transplante renal. A presença do vírus

poderia influenciar o manejo clínico desses pacientes de várias maneiras: i) a infecção por HPgV-1 poderia potencialmente alterar a resposta a terapias imunossupressoras, necessitando ajustes na dosagem; ii) o efeito imunomodulador do HPgV-1 poderia influenciar o risco de rejeição do enxerto ou a susceptibilidade a infecções oportunistas; iii) a co-infecção com outros vírus, como HCV ou HIV, poderia ser modificada pela presença de HPgV-1, afetando o prognóstico geral.

Neste estudo o TTV foi detectado em praticamente todos os *pools* avaliados por metagenômica viral. Os TTV têm sido estudados ao longo de décadas como candidatos a marcador para uma infinidade de processos patológicos, embora ainda não existam evidências de que possam estar relacionados com nenhuma doença humana.¹⁷³ Assim como observado no presente estudo, onde foi possível detectar contagens de *reads* superiores à casa dos milhões, alguns estudos de metagenômica observaram alta contagem de *reads* desses vírus no organismo de indivíduos pós-transplantados (órgãos sólidos) submetidos à intensa terapia imunossupressora. A presença desses agentes foi apontada como um possível marcador da função do sistema imune.^{144, 173, 174}

Um estudo em especial observou que em pacientes transplantados renais a alta contagem de *reads* poderia ser utilizada como um preditor de baixa imunidade e possibilitar prever o risco de infecções oportunistas nesses pacientes, com uma antecedência de até três meses.¹⁷⁵

A dinâmica da carga viral do TTV como um biomarcador do estado imunológico funcional está ganhando força na comunidade científica. A replicação do TTV é controlada principalmente pela imunidade celular, e sua carga viral no plasma aumenta de forma inversamente proporcional à intensidade da imunossupressão. Em receptores de transplante renal, um aumento acentuado na carga viral de TTV tem sido correlacionado não apenas com um risco aumentado de infecções oportunistas, mas também com um menor risco de rejeição do enxerto mediada por células T. Essa "balança imunológica" posiciona o monitoramento da carga de TTV como uma ferramenta promissora para a personalização da terapia imunossupressora,

permitindo titular a dose para um nível que minimize tanto o risco de rejeição quanto o de infecção.^{176, 177}

Estudos mais recentes têm procurado estabelecer limiares quantitativos para guiar a prática clínica. Por exemplo, uma carga viral de TTV persistentemente baixa ou indetectável pode indicar uma imunossupressão insuficiente, sinalizando um risco elevado de rejeição do aloenxerto. Inversamente, cargas virais extremamente altas podem alertar os clínicos sobre um estado de imunossupressão excessiva, que precede o desenvolvimento de infecções oportunistas graves, como as causadas por CMV ou BKV. A possibilidade de utilizar o TTV como um meio de aferir imunossupressão permite um ajuste mais dinâmico e individualizado dos regimes terapêuticos, afastando-se de protocolos baseados apenas em dosagens de medicamentos e níveis séricos, que não refletem o efeito biológico líquido no sistema imune de cada paciente.¹⁷⁸

O TTV, por sua vez, emergiu como o biomarcador funcional mais promissor do "estado imune líquido" de um paciente. Sua replicação é estranhamente sensível ao controle pelas células T. Quando a imunidade celular está robusta, a carga de TTV é baixa ou indetectável. Quando a imunossupressão farmacológica atenua a função das células T, a replicação do TTV aumenta exponencialmente. Essa correlação inversa e dinâmica permite o uso da carga viral de TTV como um "mensurador de imunossupressão" personalizado. Níveis muito altos de TTV alertam para um risco iminente de infecções oportunistas, enquanto níveis muito baixos sinalizam um risco de rejeição. O monitoramento da carga de TTV oferece, portanto, a possibilidade de titular a imunossupressão de forma individualizada, mantendo cada paciente em uma "janela terapêutica" segura, um dos maiores objetivos da medicina de transplante personalizada.^{176, 178}

Ainda que em alguns *pools* tenha ocorrido a detecção de um vírus do gênero Varicelavírus, não foi possível detectar a presença do HHV-3 em nenhum dos pacientes testados por qPCR. O único vírus, pertencente a este gênero, capaz de produzir doença em seres humanos é o HHV-3, além disso, é um agente frequentemente encontrado nesta população. Deve-se destacar

que a análise de bioinformática no sequenciamento metagenômico é crucial para a identificação precisa de alvos diagnósticos, mas ainda continua desafiadora.^{179, 180} Logo, os resultados que obtivemos podem ser causados por um erro de classificação dos *pipelines* de bioinformática.

A classificação taxonômica incorreta na metagenômica, especialmente em níveis de espécie, é uma ocorrência bem documentada e representa um dos principais desafios na implementação clínica desta tecnologia.^{84, 181} Estudos de *benchmark* demonstraram que a detecção de patógenos virais de baixa abundância e infecções mistas permanece um desafio significativo, sendo detectada por apenas 3 de 13 *pipelines* avaliados, com variações na contagem de *reads* de vírus-alvo em uma faixa de 2-3 log entre diferentes *pipelines*, indicando diferenças substanciais nos limites de detecção.¹⁸¹ Vírus do mesmo gênero, frequentemente compartilham regiões genômicas conservadas, e a classificação baseada em similaridade nucleotídica pode resultar em alinhamentos cruzados entre espécies relacionadas.¹⁸² Um *pipeline* de bioinformática pode alinhar *reads* de um vírus (por exemplo, um Varicelavírus não humano de baixa abundância ou um vírus endógeno relacionado) a um genoma de referência próximo, como o do HHV-3, resultando em uma classificação positiva ao nível de gênero, mas não ao nível de espécie. Essa ambiguidade é exacerbada quando a cobertura do genoma viral é baixa e as *reads* são curtas, impedindo uma detecção precisa. Estudos demonstraram que classificadores taxonômicos apresentam diferentes limiares padrão para detecção de sinais falso-positivos (de 0,01 a 0,5%), resultando em dezenas (Bracken, MetaPhlAn2) ou mesmo milhares (Centrifuge, CLARK, Kaiju, MMseqs2, PathSeq) de hits falso-positivos, dependendo do *workflow* utilizado.^{84, 183} A validação por qPCR, que utiliza *primers* específicos para a espécie, serve como um padrão-ouro para confirmar ou refutar essas descobertas metagenômicas preliminares, como observado em nosso estudo.^{184, 185}

Embora apresente alguns pontos técnicos que precisam ser observados e ajustados, o emprego da metagenômica viabiliza a possibilidade de realizar diagnósticos complexos. Como exemplo disso, destaca-se o relato

de caso descrito por Wilson no ano de 2017. Naquele estudo, uma paciente americana, transplantada renal, submetida à terapia imunossupressora, apresentou alterações clínicas neurológicas e o diagnóstico clínico clássico falhou em demonstrar o agente etiológico que desencadeou essa sintomatologia. Utilizando a técnica de metagenômica, foi possível detectar no liquor da paciente a presença de *reads* do vírus do Nilo Ocidental (detecção que posteriormente foi confirmada por sorologia), fechando o diagnóstico de meningoencefalite aguda pelo vírus do Nilo Ocidental.¹⁸⁶

Apesar da Febre do Nilo se apresentar como uma endemia nos Estados Unidos durante o período do verão, a manifestação clínica observada nessa paciente ocorre em menos de 1% dos indivíduos infectados com o vírus, além disso, se tratando de uma paciente transplantada renal, as suspeitas clínicas estarão voltadas preponderantemente para os agentes clássicos causadores de quadros neurológicos nessa população. Estes fatores, associados, justificam o motivo pelo qual o diagnóstico clássico falhou em detectar um agente etiológico para as manifestações clínicas da paciente.

A metagenômica permitiu a detecção de um vírus que anteriormente não havia nem sequer sido aventado como o possível causador do quadro clínico. Deste modo, reforçamos a relevância da metagenômica como uma ferramenta de apoio diagnóstico de extremo valor, especialmente em populações com o sistema imunológico fragilizado, onde manifestações clínicas mais exuberantes e raras podem ser desencadeadas por agentes etiológicos inesperados.

O poder diagnóstico da metagenômica, exemplificado pelo caso do vírus do Nilo Ocidental, reside em sua natureza agnóstica, ou "sem hipóteses". Em cenários clínicos complexos, como febre de origem desconhecida em pacientes imunocomprometidos, a abordagem metagenômica supera as limitações dos testes direcionados, que exigem uma suspeita clínica prévia. Além do diagnóstico, a metagenômica pode fornecer informações cruciais sobre a diversidade genética do patógeno, resistência a antivirais e a presença de coinfeções, que podem influenciar diretamente o manejo clínico e o prognóstico do paciente. A implementação da metagenômica como uma

ferramenta de "próxima geração" para o diagnóstico de doenças infecciosas está se tornando cada vez mais viável, embora desafios como o tempo de resposta (*turnaround time*) e a interpretação de dados ainda precisam ser otimizadas para uso rotineiro na clínica.^{186, 187}

A discussão sobre a utilidade da metagenômica, exemplificada pela detecção de agentes inesperados como o vírus do Nilo Ocidental, transcende o diagnóstico de casos raros. Ela aponta para uma mudança de paradigma na medicina de transplante: da abordagem reativa, baseada em sintomas, para uma gestão proativa e personalizada, fundamentada no perfil microbiológico único de cada paciente. A capacidade da metagenômica de fornecer um panorama completo e imparcial do viroma circulante é o alicerce dessa transformação, e dois fatores principais estão acelerando sua transição da pesquisa para a prática clínica: a drástica redução de custos e a superação da barreira do tempo de resposta.

A trajetória de custos do sequenciamento de nova geração (NGS) é, talvez, o avanço tecnológico mais impactante na biologia molecular desde a invenção da PCR. O custo para sequenciar um genoma humano, que era da ordem de bilhões de dólares durante o Projeto Genoma Humano, caiu para menos de \$ 1.000 dólares, e continua em declínio. Essa redução exponencial se reflete diretamente na viabilidade da metagenômica clínica. Estudos de custo-efetividade recentes demonstram que, embora o custo inicial de um teste metagenômico (variando de ~ \$ 100 a \$ 300 por amostra, dependendo da plataforma como Illumina ou Nanopore) seja superior ao de um qPCR individual, seu valor diagnóstico abrangente pode levar a uma economia líquida significativa. Ao identificar patógenos de forma rápida e precisa, a metagenômica pode reduzir o uso de antibioticoterapia empírica de largo espectro, diminuir o tempo de internação hospitalar e evitar a realização de múltiplos testes diagnósticos direcionados e invasivos, que, somados, ultrapassam frequentemente o custo de um único ensaio metagenômico.^{188,}

189

Igualmente crítica é a questão do tempo de resposta (*turnaround time* - *TAT*). Tradicionalmente, a metagenômica era vista como uma ferramenta de

pesquisa, com um *TAT* de semanas, incompatível com as necessidades da prática clínica. No entanto, a otimização de protocolos de extração de ácido nucleico, a automação da preparação de bibliotecas e o desenvolvimento de sequenciadores mais rápidos e plataformas de análise em nuvem mudaram drasticamente esse cenário. Atualmente, fluxos de trabalho de metagenômica rápida podem entregar resultados em menos de 24 horas, com alguns estudos demonstrando um *TAT* de 7 a 10 horas. Isso se compara favoravelmente com culturas microbiológicas, que podem levar de dias a semanas, e posiciona a metagenômica como uma ferramenta viável para o diagnóstico de infecções agudas, onde cada hora conta. A capacidade de obter um diagnóstico diferencial abrangente em um período clinicamente relevante é um divisor de águas, especialmente em pacientes imunocomprometidos com febre de origem desconhecida.^{188, 190}

A convergência da acessibilidade econômica e da velocidade diagnóstica está pavimentando o caminho para a verdadeira medicina de precisão em virologia de transplante. O monitoramento longitudinal do viroma de um paciente permite a criação de uma "linha de base" viral individual. Desvios dessa linha de base – como o surgimento de um novo vírus, ou uma mudança drástica na abundância de um vírus comensal como o TTV – podem servir como um alerta precoce de alterações no estado imunológico ou de uma infecção incipiente, antes mesmo do aparecimento de sintomas clínicos. Essa abordagem permite intervenções personalizadas: em vez de aplicar um protocolo de redução de imunossupressão padrão para todos os pacientes com viremia por BKV, um clínico poderia tomar uma decisão mais informada, considerando a carga de TTV do paciente, a presença de outros vírus imunomoduladores como o HPgV-1 e o perfil de resistência do BKV, todos fornecidos por um único teste metagenômico. Esta visão holística transforma o manejo do paciente de uma série de decisões isoladas para uma estratégia integrada e personalizada, com o potencial de melhorar significativamente os desfechos do enxerto e do paciente.^{191, 192}

A transição da metagenômica de uma ferramenta de pesquisa para uma tecnologia diagnóstica clínica rotineira está sendo acelerada por marcos

regulatórios significativos e validações clínicas robustas. O reconhecimento da FDA americana, que concedeu a designação de "*breakthrough device*" para ensaios metagenômicos automatizados em 2023, sinaliza a maturidade tecnológica desta abordagem diagnóstica (Tan et al., 2024). Estudos de validação clínica demonstraram que ensaios metagenômicos totalmente automatizados podem alcançar sensibilidade de 93,6%, especificidade de 93,8% e acurácia de 93,7% comparado ao RT-PCR multiplex padrão-ouro, com capacidade de detecção de patógenos respiratórios virais em menos de 24 horas.⁹⁴ Este desempenho, combinada com a capacidade de descoberta de vírus novos e divergentes por algoritmos de montagem *de novo*, posiciona a metagenômica não apenas como uma ferramenta diagnóstica superior, mas também como um sistema de vigilância epidemiológica essencial para a preparação pandêmica.

A integração da inteligência artificial (IA) e aprendizado de máquina está revolucionando a interpretação de dados metagenômicos, superando uma das principais barreiras para implementação clínica. Algoritmos de IA aplicados a dados metagenômicos demonstraram capacidade de melhorar significativamente a acurácia diagnóstica, superando biomarcadores tradicionais baseados em espécies ou SNVs, e oferecendo *insights* preditivos sobre resistência antimicrobiana, virulência e resposta terapêutica.^{193, 194, 195, 196} Modelos de aprendizado de máquina derivados de metagenomas estão sendo desenvolvidos para aprimorar a compreensão preditiva e interpretação diagnóstica de condições clínicas complexas, transformando dados brutos de sequenciamento em informações clinicamente acionáveis de forma automatizada.¹⁹⁷ Esta convergência entre metagenômica e IA promete não apenas acelerar o diagnóstico, mas também habilitar uma medicina de precisão verdadeiramente personalizada, onde o perfil microbiológico único de cada paciente orienta decisões terapêuticas específicas.

O mercado global de sequenciamento metagenômico reflete esta transformação tecnológica, com projeções de crescimento de USD 2,12 bilhões em 2024 para USD 16,81 bilhões até 2033, representando uma taxa de crescimento anual composta de 22,17%.^{198, 199} Esta expansão é

impulsionada não apenas pela redução contínua de custos, mas também pela crescente demanda por medicina personalizada e pelo reconhecimento do valor diagnóstico abrangente da metagenômica. Estudos de implementação em países de baixa e média renda demonstram que o investimento em metagenômica clínica pode representar uma estratégia transformadora para melhorar a saúde pública global, especialmente em contextos onde recursos diagnósticos convencionais são limitados.¹⁷⁴

A padronização de protocolos metagenômicos representa o próximo marco crítico para implementação clínica em larga escala. Iniciativas internacionais estão desenvolvendo diretrizes consensuais para extração de ácido nucleico, preparação de bibliotecas, parâmetros de sequenciamento e pipelines de bioinformática, visando garantir a comparabilidade entre laboratórios e a reprodutibilidade de resultados.²⁰¹ A automação completa de *workflows*, desde a preparação da amostra até a interpretação de resultados, está eliminando a variabilidade técnica e reduzindo a necessidade de competência especializada, tornando a metagenômica acessível a laboratórios clínicos de rotina.²⁰² Populações de alto risco, como receptores de transplantes, pacientes oncológicos e indivíduos criticamente enfermos, representam alvos práticos ideais para implementar a metagenômica clínica como padrão de cuidado, onde o valor diagnóstico justifica o investimento tecnológico e onde intervenções precoces podem ter impacto significativo nos desfechos clínicos.

O futuro da metagenômica clínica será caracterizado pela implementação de sistemas de monitoramento longitudinal integrado, onde o perfil microbiológico de cada paciente será continuamente atualizado e comparado com sua linha de base individual. Esta abordagem permitirá a detecção precoce de alterações microbiológicas antes do aparecimento de sintomas clínicos, habilitando intervenções preventivas personalizadas. A combinação da metagenômica com outras tecnologias emergentes, como sensores *wearables* para monitoramento contínuo de biomarcadores e sistemas de IA para análise preditiva, criará um ecossistema de saúde digital onde o diagnóstico molecular personalizado se tornará a norma, não a

exceção. À medida que estas tecnologias convergem e se tornam mais acessíveis, a metagenômica está posicionada para transformar fundamentalmente a prática da medicina infecciosa, estabelecendo um novo paradigma de cuidado proativo, personalizado e baseado em evidências moleculares em tempo real.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo contribui para o conhecimento do viroma circulante em receptores de transplante renal do Distrito Federal através da aplicação da metagenômica e o sequenciamento de nova geração, oferecendo informações sobre a detecção viral e limitações metodológicas. A análise metagenômica de 100 pacientes transplantados renais permitiu a detecção de múltiplos vírus clinicamente relevantes, incluindo vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), poliomavírus BK (BKV) e Pegvírus humano do tipo 1 (HPgV-1), com prevalências, para os agentes mais relevantes, que se encontram dentro da faixa reportada na literatura internacional, confirmando a relevância destes patógenos na população estudada e validando a aplicabilidade da metodologia metagenômica para detecção viral em transplantados renais.

Vislumbrando perspectivas futuras, a redução contínua de custos e melhorias tecnológicas podem tornar esta abordagem mais acessível. A longo prazo, a implementação da metagenômica promete contribuir para o cuidado de transplantados através da medicina de precisão viral, onde o monitoramento longitudinal do viroma individual permitirá a criação de "linhas de base" virais personalizadas. Desvios dessas linhas de base podem sinalizar alterações no estado imunológico antes do aparecimento de sintomas clínicos, possibilitando intervenções preventivas personalizadas que otimizem o equilíbrio entre prevenção da rejeição e minimização do risco infeccioso com base no perfil viral único de cada paciente.

Em um cenário futuro, seria possível vislumbrar a caracterização completa do viroma tanto do doador quanto do receptor realizada rotineiramente antes do transplante renal. Esta abordagem preditiva representaria uma mudança paradigmática de uma medicina reativa para uma estratégia proativa e personalizada, baseada no conhecimento detalhado do perfil viral pré-existente. Assim, a metagenômica permanece uma ferramenta promissora para diagnóstico viral em transplantados, mas sua implementação clínica rotineira ainda requer desenvolvimento adicional de protocolos

padronizados, validação extensiva e superação de desafios técnicos documentados neste estudo. Caso estas etapas sejam vencidas, o futuro da virologia de transplante será caracterizado pela integração harmoniosa entre tecnologias avançadas, medicina personalizada e cuidado humanizado, onde cada paciente receberá um manejo verdadeiramente individualizado que otimize não apenas a sobrevida do enxerto, mas também sua qualidade de vida a longo prazo.

8. REFERÊNCIAS

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1–150. 2. United States Renal Data System. 2018 USRDS annual.
2. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, et al. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int.* 2019;96:1048–1050.
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2022, February 28). Chronic kidney disease basics. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved November 9, 2022, from <https://www.cdc.gov/kidneydisease/basics.html>
4. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):1-150
5. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for chronic kidney disease: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012;157(8):567-70.
6. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr 1;3(4):a014977.
7. Hatzinger, M., Stastny, M., Grützmacher, P. et al. Die Geschichte der Nierentransplantation. *Urologe* 55, 1353–1359 (2016).
8. Kidney transplant. National Kidney Foundation. (2022, November 4). Retrieved November 11, 2022, from <https://www.kidney.org/atoz/content/kidney-transplant>
9. Augustine J. Kidney transplant: New opportunities and challenges. *Cleve Clin J Med.* 2018 Feb;85(2):138-144.
10. Snoeijs MG, Schaubel DE, Hené R, Hoitsma AJ, Idu MM, Ijzermans JN, Ploeg RJ, Ringers J, Christiaans MH, Buurman WA, van Heurn LW. Kidneys from donors after cardiac death provide survival benefit. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Jun;21(6):1015-21
11. Sun Q, Zhou H, Cao R, Lin M, Hua X, Hong L, Huang Z, Na N, Cai R, Wang G, Meng F, Sun Q. Donation after brain death followed by circulatory death, a novel donation pattern, confers comparable renal

- allograft outcomes with donation after brain death. *BMC Nephrol.* 2018 Jul 4;19(1):164
12. Sade RM. Brain death, cardiac death, and the dead donor rule. *J S C Med Assoc.* 2011 Aug;107(4):146-9.
 13. Kahwaji J, Tong C, Jordan SC, Vo A. Rituximab: An emerging therapeutic agent for kidney transplantation. *Transplant Research and Risk Management.* 2009;1:15-29
 14. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, et al. (December 2004). "Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial". *J Am Soc Nephrol.* 15 (12): 3256–62.
 15. Villicana R, Kahwaji J, Peng A, Najjar R, Jordan S, Vo A. ABO Incompatible Kidney Transplantation Using Subcutaneous Alemtuzumab for Induction and No Post Transplant Plasmapheresis [abstract]. *Am J Transplant.* 2013; 13 (suppl 5).
 16. Kasiske, B. L., Zeier, M. G., Chapman, J. R., Craig, J. C., Ekberg, H., Garvey, C. A., Green, M. D., Jha, V., Josephson, M. A., Kiberd, B. A., Kreis, H. A., McDonald, R. A., Newmann, J. M., Obrador, G. T., Vincenti, F. G., Cheung, M., Earley, A., Raman, G., Abariga, S., ... Balk, E. M. (2010). KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: A summary. *Kidney International*, 77(4), 299–311.
 17. Darshika Chhabra, M. D. (2022, March 16). Assessment and management of the Kidney Transplant Patient. Practice Essentials, Overview, Clinical Presentation. Retrieved November 11, 2022, from <https://emedicine.medscape.com/article/429314-overview#a9>
 18. Martin-Gandul, C., Mueller, N. J., Pascual, M., & Manuel, O. (2015). The Impact of Infection on Chronic Allograft Dysfunction and Allograft Survival After Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 15(12), 3024–3040.
 19. Smith SR, Butterly DW, Alexander BD, Greenberg A. Viral infections after renal transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2001 Apr;37(4):659-76. doi: 10.1016/s0272-6386(01)80114-1. PMID: 11273865.
 20. Mosimann, F., Cuénoud, PF., Steinhäuslin, F. et al. Herpes simplex esophagitis after renal transplantation. *Transpl Int* 7, 79–82 (1994).

21. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cytomegalovirus. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 11, 2022, from https://viralzone.expasy.org/180?outline=all_by_species
22. Shore, J. (2020, April 10). The bumpy road to a cytomegalovirus vaccine. The Native Antigen Company. Retrieved November 11, 2022, from <https://thenativeantigencompany.com/the-bumpy-road-to-a-cytomegalovirus-vaccine>
23. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Varicellovirus. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 19, 2022, from https://viralzone.expasy.org/179?outline=all_by_species
24. Arness, T., Pedersen, R., Dierkhising, R., Kremers, W. and Patel, R. (2008), Varicella zoster virus-associated disease in adult kidney transplant recipients: incidence and risk-factor analysis. *Transplant Infectious Disease*, 10: 260-268.
25. M. Rommelaere, C. Maréchal, J.-C. Yombi, E. Goffin, N. Kanaan. Disseminated Varicella Zoster Virus Infection in Adult Renal Transplant Recipients: Outcome and Risk Factors, *Transplantation Proceedings*, Volume 44, Issue 9, 2012, 2814-2817.
26. Moniuszko A, Sosnowska M, Zajkowska A, Garkowski A, Czupryna P, Pancewicz S, Zajkowska J. Blindness resulting from orbital complications of ophthalmic zoster. *Postepy Dermatol Alergol*. 2015 Oct;32(5):396-9.
27. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Polyomaviridae. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 20, 2022, from https://viralzone.expasy.org/148?outline=all_by_species
28. Vanichanan J, Udomkarnjananun S, Avihingsanon Y, Jutivorakool K. Common viral infections in kidney transplant recipients. *Kidney Res Clin Pract*. 2018 Dec;37(4):323-337.
29. de Padua Silva, L., Patah, P. A., Saliba, R. M., Szewczyk, N. A., Gilman, L., Neumann, J., Han, X.-Y., Tarrand, J., Ribeiro, R., Gulbis, A., Shpall, E. J., Jones, R., Popat, U., Walker, J. A., Petropoulos, D., Chiattonne, A., Stewart (2010). Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplants is the complex result of BK virus infection, preparative regimen intensity and donor type. *Haematologica*, 95(7), 1183–1190.
30. SIB Swiss Institute of Bioinformatics (2014). Pegivirus. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Retrieved November 21, 2022, from <https://viralzone.expasy.org/4860>

31. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med.* 1995;1:564-569.
32. Marano G, Franchini M, Farina B, Piccinini V, Pupella S, Vaglio S, Grazzini G, Liunbruno GM. The human pegivirus: A new name for an "ancient" virus. Can transfusion medicine come up with something new? *Acta Virol* 2017; 61: 401-412
33. Chivero ET, Stapleton JT. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. *J Gen Virol* 2015; 96: 1521-1532
34. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol* 2012; 20: 124-130
35. Lauck M, Bailey AL, Andersen KG, Goldberg TL, Sabeti PC, O'Connor DH. GB virus C coinfections in west African Ebola patients. *J Virol* 2015; 89: 2425-2429.
36. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Ávila-Ríos S, García-Morales C, Reyes-Terán G, Escobedo G, Estrada G, García-Iglesias T, Muñoz-Saucedo N, Kershenovich D, Ostrosky-Wegman P, Ruiz-Palacios GM. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One.* 2017 Sep 14;12(9):e0184494.
37. N'Guessan KF, Boyce C, Kwara A, Archampong TNA, Lartey M, Sagoe KW, Kenu E, Obo-Akwa A, Blackard JT. Human pegivirus (HPgV) infection in Ghanaians co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV). *Virus Genes.* 2018 Jun;54(3):361-367.
38. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, Celentano DD, Sobel JD, Jamieson DJ, King CC. Cytokine/chemokine expression associated with Human Pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol.* 2017 Nov;89(11):1904-1911.
39. Fernández-Ruiz M, Forque L, Albert E, Redondo N, Giménez E, López-Medrano F, González E, Polanco N, Ruiz-Merlo T, Parra P, San Juan R, Andrés A, Aguado JM, Navarro D. Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates. *Transpl Infect Dis.* 2022 Feb;24(1):e13771.
40. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, Mello FCA, Varella RB, Soares CC. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol.* 2020 Mar 13.

41. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
42. Taishan Hu, Nilesh Chitnis, Dimitri Monos, Anh Dinh, Next-generation sequencing technologies: An overview, *Human Immunology*, Volume 82, Issue 11, 2021, Pages 801-811.
43. Wetterstrand, K. A. (2021, November 1). The cost of sequencing a human genome. National Human Genome Research Institute. Retrieved November 26, 2022, from <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
44. Straiton J, Free T, Sawyer A, Martin J (February 2019). "From Sanger sequencing to genome databases and beyond". *BioTechniques*. *Future Science*. 66 (2): 60–63.
45. S.S. Jamuar, E.C. Tan, Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases, *Hum Genomics* 9 (2015) 10.
46. K.E. Fisher, L. Zhang, J. Wang, G.H. Smith, S. Newman, T.M. Schneider, et al., Clinical Validation and Implementation of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay to Detect Somatic Variants in Non-Small Cell Lung, Melanoma, and Gastrointestinal Malignancies, *J Mol Diagn* 18 (2016) 299
47. Tian X, Duan W, Zhang X, Wu X, Zhang C, Wang Z, Cao G, Gu Y, Shao F, Yan T. Metagenomic Next-Generation Sequencing Reveals the Profile of Viral Infections in Kidney Transplant Recipients During the COVID-19 Pandemic. *Front Public Health*. 2022 Jul 11;10:888064.
48. Shi Y, Wang G, Lau HC, Yu J. Metagenomic Sequencing for Microbial DNA in Human Samples: Emerging Technological Advances. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 16;23(4):2181.
49. Smith GJ, Wrighton KC. Metagenomic Approaches Unearth Methanotroph Phylogenetic and Metabolic Diversity. *Curr Issues Mol Biol*. 2019;33:57-84.
50. Taş N, de Jong AE, Li Y, Trubl G, Xue Y, Dove NC. Metagenomic tools in microbial ecology research. *Curr Opin Biotechnol*. 2021 Feb;67:184-191.
51. Naccache, S. N., A. L. Greninger, D. Lee, L. L. Coffey, T. Phan, A. Rein-Weston, A. Aronsohn, J. Hackett, Jr., E. L. Delwart and C. Y. Chiu (2013). "The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid

- genome traced to nucleic acid extraction spin columns." *J Virol* 87(22): 11966-11977
52. Quintão, T. S. C.; Silva, F. G. ; Pereira, A. L. ; Araújo, W. N. ; Oliveira, P. M. ; Souza, M. B. L. D. ; Lamounier, T. A. ; Haddad, R. . Detection and molecular characterization of enteric adenovirus in treated wastewater in the Brazilian Federal District. *SN Applied Sciences*, v. 3, p. 691, 2021.
 53. Stern J, Miller G, Li X, Saxena D. Virome and bacteriome: two sides of the same coin. *Curr Opin Virol*. 2019 Aug;37:37-43.
 54. Liang, G., Bushman, F.D. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 19, 514–527 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
 55. Pongali Raghavendra, Thammineni Pullaiah, Chapter 7 - Pathogen Identification Using Novel Sequencing Methods, Editor(s): Pongali Raghavendra, Thammineni Pullaiah, *Advances in Cell and Molecular Diagnostics*, Academic Press, 2018, Pages 161-202,
 56. Minot, S. et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res*. 21, 1616–1625 (2011).
 57. Turin, C. G. & Ochoa, T. J. The role of maternal breast milk in preventing infantile diarrhea in the developing world. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1, 97–105 (2014).
 58. Goodrich, J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799 (2014).
 59. Xie, H. et al. Shotgun metagenomics of 250 adult twins reveals genetic and environmental impacts on the gut microbiome. *Cell Syst*. 3, 572–584.e3 (2016). 127.
 60. Rothschild, D. et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555, 210–215 (2018)
 61. Gregory, A. C. et al. The Gut Virome Database reveals age-dependent patterns of virome diversity in the human gut. *Cell Host Microbe* 28, 724–740.e8 (2020).
 62. Holtz, L. R. et al. Geographic variation in the eukaryotic virome of human diarrhea. *Virology* 468, 556–564 (2014). 133.
 63. Zuo, T. et al. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut* 68, 1169–1179 (2019).

64. Rani A, Ranjan R, McGee HS, Metwally A, Hajjiri Z, Brennan DC, Finn PW, Perkins DL. A diverse virome in kidney transplant patients contains multiple viral subtypes with distinct polymorphisms. *Sci Rep*. 2016 Sep 16;6:33327.
65. Kulifaj D, Tilloy V, Scaon E, Guerin E, Essig M, Pichon N, Hantz S, De Bernardi A, Joannes M, Barranger C, Alain S. Viral metagenomics analysis of kidney donors and recipients: Torque teno virus genotyping and prevalence. *J Med Virol*. 2020 Jul 13.
66. Schreiber PW, Kufner V, Hübel K, Schmutz S, Zagordi O, Kaur A, Bayard C, Greiner M, Zbinden A, Capaul R, Böni J, Hirsch HH, Mueller TF, Mueller NJ, Trkola A, Huber M. Metagenomic Virome Sequencing in Living Donor and Recipient Kidney Transplant Pairs Revealed JC Polyomavirus Transmission. *Clin Infect Dis*. 2019 Aug 30;69(6):987-994.
67. Lewandowska DW, Schreiber PW, Schuurmans MM, Ruehe B, Zagordi O, Bayard C, et al. (2017) Metagenomic sequencing complements routine diagnostics in identifying viral pathogens in lung transplant recipients with unknown etiology of respiratory infection. *PLoS ONE* 12(5).
68. McGann K, DeWolfe D, Jacobs M, et al. Comparing urine and blood screening methods to detect BK virus after renal transplant. *Exp Clin Transplant*. 2021;19:104–109.
69. Dos Santos Bezerra R., de Melo Jorge D.M., ÍA Castro, Moretto E.L., Scalon de Oliveira L., Ubiali E.M.A., et al. Detection of Influenza A(H3N2) Virus RNA in Donated Blood. *Emerg Infect Dis*. 2020;26:1621–1623.
70. Silva, A.S.N., Silva, C.P., Barata, R.R. et al. Human pegivirus (HPgV, GBV-C) RNA in volunteer blood donors from a public hemotherapy service in Northern Brazil. *Virol J* 17, 153 (2020).
71. Slavov SN, Maraninchi Silveira R, Hespanhol MR, Sauvage V, Rodrigues ES, Fontanari Krause L, Bittencourt HT, Caro V, Laperche S, Covas DT, Kashima S. Human pegivirus-1 (HPgV-1) RNA prevalence and genotypes in volunteer blood donors from the Brazilian Amazon. *Transfus Clin Biol*. 2019 Nov;26(4):234-239.
72. Miao Z., Gao L., Song Y., Yang M., Zhang M., Lou J. et al. Prevalence and clinical impact of human Pegivirus-1 infection in HIV-1-Infected individuals in Yunnan, China. *Viruses*. 2017; 9 (15, pii:E28)
73. Fellner, M. D., Durand, K., Rodriguez, M., Irazu, L., Alonio, V., & Picconi, M. A. (2014). Duplex realtime PCR method for Epstein–Barr virus and human DNA quantification: Its application for post-transplant

lymphoproliferative disorders detection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(3), 271–280.

74. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods*. 2002;100(1-2):27-35.
75. Abou-Jaoudé M, El Hage S, Akiki D, Fadlallah M, Ghaith AK, Dib A. Cytomegalovirus infection in kidney transplant patients: Prevalence, risk factors, and impact on outcome - A local multicentre experience. *Transpl Immunol*. 2021 Dec;69:101473.
76. Hemmersbach-Miller M, Alexander BD, Pieper CF, Schmader KE. Age matters: older age as a risk factor for CMV reactivation in the CMV serostatus-positive kidney transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Mar;39(3):455-463.
77. Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 319-338.
78. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. 2008. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 36(16):e105.
79. Kozarewa I, Ning Z, Quail MA, Sanders MJ, Berriman M, Turner DJ. 2009. Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of GC-biased genomes. *Nat. Methods* 6(4):291–95
80. Sabina, Jeffrey, and John H. Leamon. "Bias in whole genome amplification: causes and considerations." *Whole Genome Amplification*. Humana Press, New York, NY, 2015. 15-41.
81. Gawad, Charles, Winston Koh, and Stephen R. Quake. "Single-cell genome sequencing: current state of the science." *Nature Reviews Genetics* 17.3 (2016): 175.
82. Self, S., McMahan, C., & Mokalled, S. (2022). Capturing the pool dilution effect in group testing regression: A Bayesian approach. *Statistics in Medicine*, 41(23), 4682-4696.
83. Abdelrazik, A. M., El Said, M. N., & Abdelaziz, H. M. (2023). Evaluation of pooling strategy of SARS-CoV-2 RT-PCR in limited resources setting in

- Egypt at low prevalence. *Comparative Clinical Pathology*, 32(3), 375-381.
84. Jurasz, H., Pawłowski, T., & Perlejewski, K. (2021). Contamination issue in viral metagenomics: problems, solutions, and clinical perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12, 745076.
 85. Pullerits, K. et al. (2022) "Kidney transplant-associated viral infection rates and outcomes in a single-centre cohort," *Viruses*, 14(11), p. 2406.
 86. Blazquez-Navarro, A. et al. (2018) "BKV, CMV, and EBV interactions and their effect on graft function one year post-renal transplantation: Results from a large multi-centre study," *EBioMedicine*, 34, pp. 113–121.
 87. Ethem, U. et al. (2018) "Viral infections after kidney transplantation: An updated review," *International Journal of Virology and AIDS*, 5(1).
 88. Cukuranovic, J. et al. (2012) "Viral infection in renal transplant recipients," *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1–18.
 89. Cohen, J. I. (2007). Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2601-2614.
 90. Thorley-Lawson, D. A., & Gross, A. (2004). Persistence of Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 350(13), 1328-1337.
 91. Morton, M., Coupes, B., Roberts, S. A., Johnson, S. L., Klapper, P. E., Vallely, P. J., & Picton, M. L. (2014). Epstein–Barr virus infection in adult renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 14(7), 1619-1629.
 92. Blazquez-Navarro, A., Dang-Heine, C., Wittenbrink, N., Bauer, C., Wolk, K., Sabat, R., ... & Reinke, P. (2021). Risk factors for Epstein–Barr virus reactivation after renal transplantation: Results of a large, multi-centre study. *Transplant International*, 34(9), 1669-1681.
 93. Carbo, E. C., Russcher, A., Kraakman, M. E., Sidorov, I. A., Feltkamp, M. C., Kroes, A. C., & de Vries, J. J. (2022). Longitudinal monitoring of DNA viral loads in transplant patients using quantitative metagenomic next-generation sequencing. *Pathogens*, 11(2), 236.
 94. Tan, J. K., Tan, L. W., Kang, A., Loh, J. P., Chia, P. Y., Tan, B. H., ... & Maurer-Stroh, S. (2024). Laboratory validation of a clinical metagenomic next-generation sequencing assay for pathogen detection. *Nature Communications*, 15(1), 6290.

95. Kenney, S. C. (2007). Reactivation and lytic replication of EBV. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Chapter 25). Cambridge University Press.
96. SoRelle, E. D., Dai, Y., Seifert, J., Ye, C., Baladandayuthapani, V., Jiang, N., ... & Weinberg, J. S. (2024). Epstein-Barr virus reactivation induces divergent abortive, reprogrammed, and host shutoff states by lytic progression. *Cell Reports*, 43(1), 113649.
97. Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Pronk, I., van Der Bij, W., Harmsen, M. C., The, T. H., ... & Middeldorp, J. M. (2002). Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood*, 99(11), 4315-4320.
98. Zanella, M. C., Cordey, S., & Kaiser, L. (2020). Beyond cytomegalovirus and Epstein-Barr virus: a review of viruses composing the blood virome of solid organ transplant and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(1), e00027-20.
99. Green, M. (2013). Epstein–Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *American Journal of Transplantation*, 13(s3), 41-54.
100. Le, J., Durand, C. M., Agha, I., & Brennan, D. C. (2017). Epstein–Barr virus and renal transplantation. *Transplantation Reviews*, 31(2), 73-84.
101. Ebinger, A., Fischer, S., & Höper, D. (2021). A theoretical and generalized approach for the assessment of the sample-specific limit of detection for clinical metagenomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 732-742.
102. Krishnakumar, R., Sinha, A., Bird, S. W., Jayamohan, H., Edwards, H. S., Schoeniger, J. S., Patel, K. D., Branda, S. S., & Bartsch, M. S. (2018). Systematic and stochastic influences on the performance of the MinION nanopore sequencer across a range of nucleotide bias. *Scientific Reports*, 8(1), 3159.
103. Parras-Moltó, M., Rodríguez-Galet, A., Suárez-Rodríguez, P., & López-Bueno, A. (2018). Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. *Microbiome*, 6(1), 119.
104. Cleary, B., Brito, I. L., Huang, K., Gevers, D., Shea, T., Young, S., & Alm, E. (2015). Detection of low-abundance bacterial strains in metagenomic datasets by eigengenome partitioning. *Nature Biotechnology*, 33(10), 1053-1060.

105. Quinlan, S. C., Pfeiffer, R. M., Morton, L. M., & Engels, E. A. (2011). Risk factors for early-onset and late-onset post-transplant lymphoproliferative disorder in kidney recipients in the United States. *American Journal of Hematology*, 86(2), 206-209.
106. Allen, U., Preiksaitis, J., & Practice, A. S. T. I. D. C. O. (2002). Epstein-Barr virus infection in transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 2(8), 707-714.
107. Stefanelli, L. F., Alessi, M., Di Bella, C., Billo, M. E., Viola, L., Benvenuto, M., ... & Coppola, N. (2023). EBV reactivation in transplant recipients following SARS-CoV-2 infection: a retrospective study. *Pathogens*, 12(12), 1435.
108. Dogan, B., Kocyigit, I., Sipahioglu, M. H., Tokgoz, B., Oymak, O., & Utas, C. (2024). Post-transplant lymphoproliferative disorder associated with Epstein-Barr virus in kidney transplant recipients: A single-center experience. *Journal of Medical Virology*, 96(7), e29767.
109. Bamoulid, J., Courivaud, C., Coaquette, A., Chalopin, J. M., Gaiffe, E., Saas, P., & Ducloux, D. (2013). Subclinical Epstein–Barr virus viremia among adult renal transplant recipients: incidence and consequences. *American Journal of Transplantation*, 13(3), 656-662.
110. Allen, U. (2009). Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder. *American Journal of Transplantation*, 9(3), 459-465.
111. Burton, C., Mabilangan, C., Krentz, H., Preiksaitis, J., Cervera, C., Hirsch, H., ... & Humar, A. (2025). Incidence and timing of Epstein–Barr virus whole blood DNAemia in Epstein–Barr virus-mismatched adult and pediatric solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*, 27(1), e14370.
112. Franceschini, E., Plessi, J., Zona, S., Santoro, A., Digaetano, M., Rogati, C., ... & Guaraldi, G. (2017). Clinical utility of Epstein-Barr virus viral load monitoring and risk factors for posttransplant lymphoproliferative disorders after kidney transplantation: a single-center, 10-year observational cohort study. *Transplantation Direct*, 3(7), e173.
113. Ladfors, S. W., Wahlin, A., Näsman, A., Cherif, H., Hägglund, H., Mattsson, J., ... & Ljungman, P. (2019). Long-lasting chronic high load carriage of Epstein-Barr virus is more common in young adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 54(7), 1030-1039.

114. Hwang EA, Kang MJ, Han SY, Park SB, Kim HC. Viral infection following kidney transplantation: Long-term follow-up in a single center. *Transplantation Proceedings*. 2004;36(7):2118-2119.
115. Taherimahmoudi M, Ahmadi H, Baradaran N, et al. Cytomegalovirus Infection and Disease Following Renal Transplantation: Preliminary Report of Incidence and Potential Risk Factors. *Transplantation Proceedings*. 2009;41(7):2841-2844.
116. Komorowska-Jagielska K, Heleniak Z, Dębska-Ślizień A. Cytomegalovirus Status of Kidney Transplant Recipients and Cardiovascular Risk. *Transplantation Proceedings*. 2018;50(6):1868-1873.
117. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*. 2019;33(9).
118. Jun K, Lim J, Hwang J, et al. Selection of More Vulnerable Patients for Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients With Antithymocyte Globulin Induction Therapy: An Analysis of Risk Factors and Cell-Mediated Immunity. *Transplantation proceedings*. 2021;53(7):2252-2260.
119. de Paula MI, Bae S, Shaffer AA, et al. The Influence of Antithymocyte Globulin Dose on the Incidence of CMV Infection in High-risk Kidney Transplant Recipients Without Pharmacological Prophylaxis. *Transplantation*. 2020;104(10):2139-2147.
120. Wolf S, Hoffmann VS, Sommer F, et al. Effect of Sirolimus vs. Everolimus on CMV-Infections after Kidney Transplantation—A Network Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(14):4216-4216. doi:<https://doi.org/10.3390/jcm11144216>
121. 114. Fishman, J. A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2601-2614.
122. 115. Jackson, S. E., Redeker, A., & Arens, R. (2011). Cytomegalovirus immune evasion. *Journal of Clinical Virology*, 52(1), 1-6.
123. Kanter J, Pallardó L, Gavela E, et al. Cytomegalovirus Infection Renal Transplant Recipients: Risk Factors and Outcome. *Transplantation Proceedings*. 2009;41(6):2156-2158.
124. Dominika Deborska-Materkowska, Agnieszka Perkowska-Ptasinska, Sadowska A, et al. Diagnostic utility of monitoring cytomegalovirus-

- specific immunity by QuantiFERON-cytomegalovirus assay in kidney transplant recipients. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18(1).
125. Chiasakul T, et al. Risk Factors of Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: A Single-Center Study in Thailand. *Transplantation Proceedings*. 2015;47(8):2460-2464.
 126. Posadas Salas, M. A., et al. Critical analysis of valganciclovir dosing and renal function on the development of cytomegalovirus infection in kidney transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2013;15(6):551-558.
 127. J. Díaz, Henao J, Rodelo J, Á. García, M. Arbeláez, Jaimes F. Incidence and Risk Factors for Cytomegalovirus Disease in a Colombian Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(1):160-166.
 128. Tang Y, Guo J, Li J, Zhou J, Mao X, Qiu T. Risk factors for cytomegalovirus infection and disease after kidney transplantation: A meta-analysis. *Transplant Immunology*. 2022;74:101677.
 129. Agrawal A, Ison MG, Danziger-Isakov L. Long-Term Infectious Complications of Kidney Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2021;17(2):CJN.15971020.
 130. Knowles WA. Discovery and Epidemiology of the Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC Virus (JCV). *Advances in Experimental Medicine and Biology*.:19-45.
 131. Cobos M, L. Aquilia, Garay E, et al. Epidemiologic Study and Genotyping of BK Virus in Renal Transplant Recipients. *Transplantation proceedings*. 2018;50(2):458-460.
 132. Gras J, Le Flécher A, Dupont A, et al. Characteristics, risk factors and outcome of BKV nephropathy in kidney transplant recipients: a case–control study. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23(1).
 133. Jacobi J, Prignitz A, Maïke Büttner, et al. BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. *BMC Nephrology*. 2013;14(1).
 134. Shatizadeh Malekshahi S, Soleimanjahi H, Dorostkar F, Salimi V, Farahmand M. Survey of BK Virus in Renal Transplant Recipients in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intervirology*. 2020;64(1):27-35.

135. Pajenda S, Gerges DA, Freire R, Wagner L, Hevesi Z, Aiad M, Eder M, Schmidt A, Winnicki W, Eskandary FA. Acute Kidney Injury and BK Polyomavirus in Urine Sediment Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(24):17511.
136. Hirsch, H. H., Randhawa, P., & The AST Infectious Diseases Community of Practice. (2019). BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 19(S3), 179-192.
137. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;30(2):209-217. doi:<https://doi.org/10.1093/ndt/gfu023>
138. Favi E, Puliatti C, Sivaprakasam R, et al. Incidence, risk factors, and outcome of BK polyomavirus infection after kidney transplantation. *World Journal of Clinical Cases*. 2019;7(3):270-290.
139. Kotton CN, Kamar N, Wojciechowski D, et al. The Second International Consensus Guidelines on the Management of BK Polyomavirus in Kidney Transplantation. *Transplantation*. Published online April 12, 2024
140. 117 81. De Filippi F, Lampertico P, Soffredini R, et al. High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Dig Liver Dis*. 2001;33:477-9 25.
141. 118 82. Kallinowski B, Seipp S, Dengler T, et al. Clinical impact of hepatitis G virus infection in heart and liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2002;34:2288-91
142. 119 83. Corbi C, Traineau R, Esperou H, et al. Prevalence and clinical features of hepatitis G virus infection in bone marrow allograft recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20:965-8
143. 120 84. Izumi T, Sakata K, Okuzaki D, Inokuchi S, Tamura T, Motooka D, Nakamura S, Ono C, Shimokawa M, Matsuura Y, Mori M, Fukuhara T, Yoshizumi T. Characterization of human pegivirus infection in liver transplantation recipients. *J Med Virol*. 2019 Dec;91(12):2093-2100.
144. 121 85. Thijssen M, Tacke F, Beller L, Deboutte W, Yinda KC, Nevens F, Laleman W, Van Ranst M, Pourkarim MR. Clinical relevance of plasma virome dynamics in liver transplant recipients. *EBioMedicine* 2020; 60.
145. 122. Filho RR, Carneiro MADS, Teles SA, Dias MJ, Cardoso DDP, Lampe E, Yoshida CFT, Martins RMB (2004) GB virus C/hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(6):639–643.

146. 123. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, Mello FCA, Varella RB, Soares CC (2020) Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol* 92(12):2961–2968.
147. 124. Erensoy S, Zeytinoglu A, Göksel S, Ozacar T, Ozkahya M, Ok E, Tuumlarkoglu S, Bilgiç A (2002) GB virus C/hepatitis G virus infection among renal transplant recipients in Izmir, Turkey: Molecular analysis of phylogenetic groups. *Int J Infect Dis* 6:242–243.
148. 125. Fernández-Ruiz M, Forque L, Albert E, Redondo N, Giménez E, López-Medrano F, González E, Polanco N, Ruiz-Merlo T, Parra P, San Juan R, Andrés A, Aguado JM, Navarro D (2022) Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates. *Transpl Infect Dis* 24(1):e13771.
149. 126. Odeh RA, Yasin S, Nasrallah G, Babi Y (2010) Rates of infection and phylogenetic analysis of GB virus-C among Kuwaiti and Jordanian blood donors. *Intervirology* 53(6):402-7.
150. 127. Bhattarai, N., & Stapleton, J. T. (2012). GB virus C: the good-guy virus. *Journal of the British HIV Association*, 13(3), 134-139.
151. 128. Chivero, E. T., et al. (2015). GB virus C E2 protein inhibits IL-12-dependent natural killer cell function. *Virology*, 485, 116-127.
152. 129. Slavov SN, Silveira RM, Rodrigues ES, Diefenbach CF, Zimmermann AM, Covas DT, Kashima S (2019) Human pegivirus-1 (HPgV-1, GBV-C) RNA prevalence and genotype diversity among volunteer blood donors from an intra-hospital hemotherapy service in Southern Brazil. *Transfus Apher Sci* 58(2):174-178.
153. 130. Goubau P, Andrade FB, Liu H-F, Basilio FP, Croonen L and Barreto-Gomes VAF (1999) Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in north-eastern Brazil. *Tropical Medicine & International Health* 4:365-367.
154. 131. Pinho JRR, Zanutto PMA, Ferreira JLP, Sumita LM, Carrilho FJ, Silva LC, Capacci ML, Silva AO, Guz B, Gonçalves Jr FL, Gonçalves NSL, Buck GA, Meyers GA, Bernardini AP (1999) High prevalence of GB virus C in Brazil and molecular evidence for intrafamilial transmission. *J Clin Microbiol* 37: 1634-1637.
155. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, Fachini R, Wendel S (2003) High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45:75-78.

156. 131. Mota LDD, Finger-Jardim F, Silva CM, Germano FN, Nader MM, Gonçalves CV, Luquez KYS, Chies JAB, Groll AV, Hora VPD, Silveira J, Basso RP, Soares MA, Martínez AMB (2019) Molecular and Clinical Profiles of Human Pegivirus Type 1 Infection in Individuals Living with HIV-1 in the Extreme South of Brazil. *Biomed Res Int* 2019:8048670.
157. 132. Watanabe MA, Milanezi CM, Silva WA Jr, de Lucena Angulo I, Santis G, Kashima S, da Costa JA, Neto MM, Covas DT (2003) Molecular investigation of GB virus C RNA in hemodialysis and thalassemics patients from Brazil. *Ren Fail* 25:67-75.
158. 133. Lampe E, Saback FL, Yoshida CFT, Niel C (1997) Infection with GB virus C/hepatitis G virus in Brazilian hemodialysis and hepatitis patients and asymptomatic individuals. *J Med Virol* 52:61-67.
159. 134. Fernandez JL, Valtuille R, Hidalgo A, Del Pino N, Lef L, Rendo P (2000) Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients and its relationship with hepatitis C virus infection. *Am J Nephrol* 20:380-384.
160. 135. Graninger M, Aberle S, Görzer I, Jaksch P, Puchhammer-Stöckl E (2021) Human pegivirus 1 infection in lung transplant recipients: Prevalence, clinical relevance and kinetics of viral replication under immunosuppressive therapy. *J Clin Virol* 143:104937
161. 136. Alcalde R, Nishiya AS, Casseb J, Inocencio L, Fonseca LA, Duarte AJ (2010) Prevalence and distribution of the GBV-C/ HGV among HIV-1 infected patients under antirretroviral therapy. *Virus Res* 151:148–152.
162. 137. De Oliveira LA, Martins RMB, Carneiro MADS, Teles SA, Silva SA, Cardoso DDP, Lampe E, Yoshida CFT (2002) Prevalence and genotypes of GB Virus C/Hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97(7):953–957.
163. 138. Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M, Niel C (1998) Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/ hepatitis G virus in Brazil. *J Med Virol* 56:39-43.
164. 139. Silva ASN, Silva CP, Barata RR, da Silva PVR, Monteiro PDJ, Lamarão L, Burbano RMR, Nunes MRT, de Lima PDL (2020) Human pegivirus (HPgV, GBV-C) RNA in volunteer blood donors from a public hemothrapy service in Northern Brazil. *Virol J* 17(1):153. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01427-6>
165. 140. da Silva AS, de Campos GM, Villanova MG, Bezerra RDS, Santiago LMM, Haddad R, Covas DT, Giovanetti M, Alcantara LCJ, Elias MC, Sampaio SC, Kashima S, Slavov SN (2023) Human Pegivirus-1

Detection and Genotyping in Brazilian Patients with Fulminant Hepatitis. *Pathogens* 12:1122.

166. 140. Kennedy N, Tong CY, Beeching NJ, Lamden K, Williams H, Mutton KJ, Hart CA (1998) Hepatitis G virus infection in drug users in Liverpool. *J Infect* 37(2):140-7.
167. 141. Neibecker M, Schwarze-Zander C, Rockstroh JK, Spengler U, Blackard JT (2011) Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol* 83(4):685-94.
168. 142. N'Guessan KF, Anderson M, Phinius B, Moyo S, Malick A, Mbangiwa T, Choga WT, Makhema J, Marlink R, Essex M, Musonda R, Gaseitsiwe S, Blackard JT (2017) The Impact of Human Pegivirus on CD4 Cell Count in HIV-Positive Persons in Botswana. *Open Forum Infect Dis* 4(4):ofx222. <https://10.1093/ofid/ofx222>
169. 143. Xiang J, Sathar MA, McLinden JH, Klinzman D, Chang Q, Stapleton JT (2005) South African GB virus C isolates: interactions between genotypes 1 and 5 isolates and HIV. *J Infect Dis* 192(12):2147-51.
170. 144. Yu ML, Chuang WL, Dai CY, Lu SN, Wang JH, Huang JF, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Tsai JF, Wang LY, Chang WY (2001) The serological and molecular epidemiology of GB virus C/hepatitis G virus infection in a hepatitis C and B endemic area. *J Infect* 42(1):61-6. <https://10.1053/jinf.2000.0785>
171. 145. Lee CK, Tang JW, Chiu L, Loh TP, Olszyna D, Chew N, Archuleta S, Koay ES (2014) Epidemiology of GB virus type C among patients infected with HIV in Singapore. *J Med Virol* 86(5):737-44.
172. 146. Naseri A, Anvari E, Mirnurollahi S, Fateh A. Molecular prevalence and genotypic distribution of human pegivirus-1 among Iranian hemodialysis patients. *Virus Res.* 2025 Jun;356:199582. doi: 10.1016/j.virusres.2025.199582.
173. 147. 86. Rezahosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, Perch M, Ostrowski SR, Nielsen SD. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2019 Jul;33(3):137-144.
174. 148. 87. Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkiew S, Fish I, Höller K, Sierra S, Knops E, Kaiser R, Scheid C, Di Cristanziano V. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol.* 2017 Oct;206(5):355-362.

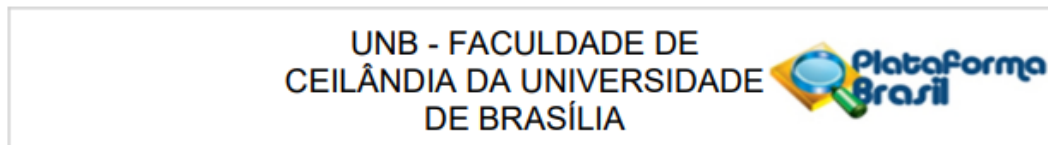
175. 149. 88. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, Kikic Ž, Gualdoni GA, Vossen MG, Rasoul-Rockenschaub S, Herkner H, Böhmig GA, Bond G. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis.* 2018 Sep 8;218(8):1191-1199.
176. 150. Doberer, K., et al. (2021). Torque Teno Virus-A Novel Biomarker for the Prediction of Allograft Rejection and Infection in Kidney Allograft Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), e2049-e2057.
177. 151. van der Heiden, M., et al. (2021). Torque Teno Virus as a Novel Tool for Personalized Immunosuppression in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 12, 701435.
178. 152. Schütz, M., et al. (2020). TTV-guiding of immunosuppression after kidney transplantation—a randomized, controlled, multi-center trial. *Trials*, 21(1), 1-10.
179. 153. 89. Bergsten E, Mestivier D, Sobhani I. The Limits and Avoidance of Biases in Metagenomic Analyses of Human Fecal Microbiota. *Microorganisms*. 2020 Dec 9;8(12):1954.
180. 154. 90. Govender KN, Street TL, Sanderson ND, Eyre DW. Metagenomic Sequencing as a Pathogen-Agnostic Clinical Diagnostic Tool for Infectious Diseases: a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies. *J Clin Microbiol.* 2021 Aug 18;59(9):e0291620.
181. 155. de Vries, J. J., Brown, J. R., Fischer, N., Sidorov, I. A., Morfopoulou, S., Huang, J., ... & Claas, E. C. (2021). Benchmark of thirteen bioinformatic pipelines for metagenomic virus diagnostics using datasets from clinical samples. *Journal of Clinical Virology*, 141, 104908.
182. 156. Nooij, S., Schmitz, D., Vennema, H., Kroneman, A., & Koopmans, M. P. (2018). Overview of virus metagenomic classification methods and their biological applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 749.
183. 157. Ye, S. H., Siddle, K. J., Park, D. J., & Sabeti, P. C. (2019). Benchmarking metagenomics tools for taxonomic classification. *Cell*, 178(4), 779-794.
184. 158. Naccache, S. N., Federman, S., Veeraraghavan, N., Zaharia, M., Lee, D., Samayoa, E., ... & Chiu, C. Y. (2014). A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Research*, 24(7), 1180-1192.

185. 159. Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, 36(4), 1303-1304.
186. 160. 91. Wilson MR, Zimmermann LL, Crawford ED, Sample HA, Soni PR, Baker AN, Khan LM, DeRisi JL. Acute West Nile Virus Meningoencephalitis Diagnosed Via Metagenomic Deep Sequencing of Cerebrospinal Fluid in a Renal Transplant Patient. *Am J Transplant*. 2017 Mar;17(3):803-808.
187. 161. Simner, P. J., Miller, S., & Carroll, K. C. (2018). Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 66(5), 778-788.
188. 162. Yin, Y., et al. (2024). Clinical and cost analysis of an ultra-rapid metagenomic sequencing test for pathogen detection in adult patients with sepsis. *Chinese Medical Journal*, 137(15), 1882-1884.
189. 163. Greninger, A. L. (2018). The challenge of diagnostic metagenomics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(7), 605-615.
190. 164. Chiu, C. Y., & Miller, S. A. (2019). Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 341-355.
191. 165. Marais, G., et al. (2023). A case for investment in clinical metagenomics in low-income and middle-income countries. *The Lancet Microbe*, 4(3), e192-e199.
192. 166. Satam, H., et al. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997.
193. 167. Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L. S., Vikesland, P., & Zhang, L. (2018). DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, 6, 23.
194. 168. Kim, J. I., Maguire, F., Tsang, K. K., Gouliouris, T., Peacock, S. J., McAllister, T. A., McArthur, A. G., & Beiko, R. G. (2022). Machine Learning for Antimicrobial Resistance Prediction: Current Practice, Limitations, and Clinical Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), e00179-21.
195. 169. Xie, R., Li, J., Wang, J., Dai, W., Leier, A., Marquez-Lago, T. T., Akutsu, T., Lithgow, T., Song, J., & Zhang, Y. (2021). DeepVF: a deep

- learning-based hybrid framework for identifying virulence factors using the stacking strategy. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), bbaa125.
196. 170. Chen, C., Xu, Y., Ouyang, J., Xiong, X., Łabaj, P. P., Chmielarczyk, A., Róžańska, A., Zhang, H., Liu, K., Shi, T., & Wu, J. (2025). VirulentHunter: deep learning-based virulence factor predictor illuminates pathogenicity in diverse microbial contexts. *Briefings in Bioinformatics*, 26(3), bbaf271.
 197. 171. Wijaya, J., Park, J., Yang, Y., Siddiqui, S. I., & Oh, S. (2024). A metagenome-derived artificial intelligence modeling framework advances the predictive diagnosis and interpretation of petroleum-polluted groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 472, 134513.
 198. 172. Precedence Research. (2025). Metagenomic sequencing market size to hit USD 16.81 billion by 2034 (Report Code: 2819). <https://www.precedenceresearch.com/metagenomic-sequencing-market>
 199. 173. Grand View Research: Grand View Research. (2025). Whole genome sequencing market size, share & trends analysis report 2025-2030 (Report ID: GVR-4-68040-037-0). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/whole-genome-sequencing-market-report>
 200. 174. Marais, G., et al. (2023). A case for investment in clinical metagenomics in low-income and middle-income countries. *The Lancet Microbe*, 4(3), e192-e199.
 201. 175. Batool, M., Khalid, N., Hussain, M. A., Zahra, R., & Iqbal, M. (2023). Clinical metagenomics—challenges and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1186424.
 202. 176. Gauthier, N. P. G., Chan, W., Locher, K., Smailus, D., Coope, R., Charles, M., Jassem, A., Kopetzky, J., Chorlton, S. D., & Manges, A. R. (2024). Validation of an automated, end-to-end metagenomic sequencing assay for agnostic detection of respiratory viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 230(6), e1245–e1253.

ANEXOS

ANEXO A – Documento de aprovação pelo Comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Soro Molecular de Herpesvírus humanos em pacientes transplantados renais

Pesquisador: Rodrigo Haddad

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83811718.8.0000.8093

Instituição Proponente: Faculdade de Ceilândia - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.672.228

Apresentação do Projeto:

“Os Herpesvirus Humanos (HHVs) integram a família Herpesviridae. Tem como único hospedeiro o homem, possui uma grande difusão latente, uma vez que ocorre a infecção, perdura no organismo do indivíduo por toda sua vida de forma latente ou lítica. A família Herpesviridae é composta por 3 subfamílias, -herpesviridae (Herpesvirus simples tipo I e II (HHV I e HHV II) e Vírus da Varicela Zoster (VZV ou HHV-3)), – herpesviridae (Citomegalovirus (CMV ou HHV-5), Herpesvírus tipo 6 (HHV-6) e Herpesvirus tipo 7 (HHV-7)) e – herpesviridae (Vírus Epstein-Barr (EBV ou HHV-4) e Herpesvirus tipo 8 (HHV-8)). Os HHVs são partículas virais constituídas capsídeo icosaédrico com genoma de DNA dupla fita, tegumento de estrutura fibrilar e envelope constituído por bicamada lipídica de origem celular e glicoproteínas virais. Os HHVs são agentes patogênicos que causam infecções oportunistas e de forma generalizada, em indivíduos com sistema imunológico comprometido, como por exemplo, receptores de aloenxertos renais, por meio da reativação viral. Os indivíduos que fazem uso de imunossupressores, principalmente nos primeiros períodos após o transplante, por haver administração de doses maiores desses medicamentos, estão vulneráveis a reativação dos HHVs latente, podendo causar quadros clínicos comprometedores, diversas síndromes, inflamações, interações com outros vírus, mielite, hepatite, rejeição do aloenxerto e até mesmo morte do paciente. Os HHVs mais relevantes para esse grupo de indivíduos são: HHV-4 ou EBV, CMV ou HHV-5, HHV-6, HHV-7 e HHV-8. O objetivo do estudo é investigar a presença dos Herpesvirus Humanos mais relevantes (EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) em indivíduos

Endereço: UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT07/66
Bairro: CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

imunocomprometidos submetidos a transplante renal no Hospital Universitário de Brasília a partir da análise sorologia e/ou molecular de 250 amostras de sangue de pacientes submetidos a Transplantes renais do Hospital Universitário de Brasília, colhidas em exames de rotina. A pesquisa não acarretará riscos para os pacientes e os mesmos serão submetidos a TCLE, como um convite aos possíveis participantes. Serão incluídas amostras de pacientes transplantados renais, maiores de 18 anos e de ambos os sexos. Serão excluídos pacientes menores de 18 anos. Será realizada análises sorológicas por meios da detecção de anticorpos de fase aguda (IgM) ou crônica (IgG) por meio de Kit de ELISA, Imunofluorescência, aglutinação ou outras técnicas imunológicas e testes moleculares por meio de Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA viral por meio do PCR convencional, Nested-PCR ou PCR em tempo real."

Objetivo da Pesquisa:

- Investigar a presença dos Herpesvirus Humanos mais relevantes (EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) em indivíduos imunocomprometidos submetidos a transplante renal no Hospital Universitário de Brasília;
- Realizar análise sorológica e/ou molecular de 250 amostras de sangue, de pacientes submetidos a transplantes renais do Hospital Universitário de Brasília, colhidas em exames de rotina para verificar a presença viral de EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os resultados obtidos neste estudo irão auxiliar no entendimento do efeito da reativação viral, sua problemática e suas possíveis consequências na saúde do paciente transplantado e a prevalência desse vírus nessa população. A coleta das amostras utilizadas neste trabalho oferece poucos riscos aos pacientes, como casos de hematomas e pequenos sangramentos no local da punção venosa. No caso de hematoma, o indivíduo será orientado a fazer compressas de gelo no local por 15 minutos durante as primeiras horas após a punção. No caso de sangramentos, o indivíduo será orientado a pressionar o local por um minuto com algodão e será fornecido um curativo pós-punção para conter o sangramento. No momento do exame de rotina o profissional responsável pela coleta contará com um tubo adicional que será destinado a pesquisa. Em relação aos resultados obtidos no decorrer da pesquisa, caso haja a identificação de reativação de algum agente viral identificado, o médico responsável pelo acompanhamento do indivíduo transplantado será comunicado. O médico comunicará o paciente e utilizará o resultado para direcionar o seu tratamento de forma mais específica. Ainda, os resultados serão mantidos de forma confidencial, e as amostras serão identificadas numericamente de forma que os indivíduos não serão

Endereço: UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT07/66
Bairro: CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CEILÂNDIA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.672.228

reconhecidos por pessoas externas à pesquisa.

Benefícios:

Os resultados obtidos neste estudo irão auxiliar no entendimento do efeito da reativação viral, sua problemática e suas possíveis consequências na saúde do paciente transplantado e a prevalência desse vírus nessa população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um Trabalho de conclusão de curso da aluna Ananda Kadja Cunegundes Santos Barbosa sob a orientação do Prof. Rodrigo Haddad, da FCE/UnB, e da colaboração externa do Dr. Svetoslav Nanev Slavov do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. Será composta por uma amostra de sangue de 250 pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo de pesquisa em consonância com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Cabe ressaltar que compete ao pesquisador responsável: desenvolver o projeto conforme delineado; elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1052151.pdf	23/05/2018 15:40:06		Aceito

Endereço: UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT07/66
Bairro: CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

**UNB - FACULDADE DE
CEILÂNDIA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 2.672.228

Recurso Anexado pelo Pesquisador	respostaCEP.pdf	23/05/2018 15:39:38	Rodrigo Haddad	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoHHV.pdf	23/05/2018 15:38:33	Rodrigo Haddad	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/05/2018 15:37:50	Rodrigo Haddad	Aceito
Outros	termoproponente.pdf	27/02/2018 14:54:24	Rodrigo Haddad	Aceito
Orçamento	planilha_orcamento.pdf	27/02/2018 09:01:21	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	27/02/2018 09:00:43	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade_pesquisador.pdf	27/02/2018 09:00:04	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento.pdf	27/02/2018 08:59:31	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	curriculo_svetoslav.pdf	27/02/2018 08:58:28	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	curriculo_rodrigo.pdf	27/02/2018 08:57:44	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	curriculo_ananda.pdf	27/02/2018 08:56:41	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	termo_de_ciencia_instituicao_co.pdf	19/02/2018 22:08:21	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Outros	termo_de_concordancia_institu.pdf	19/02/2018 22:07:42	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	07/02/2018 09:35:58	ANANDA KADJA CUNEGUNDES SANTOS BARBOSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT07/66
Bairro: CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CEILÂNDIA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.672.228

Não

BRASILIA, 23 de Maio de 2018

Assinado por:
Dayani Galato
(Coordenador)

Endereço: UNB - Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED), Centro Metropolitano, conj. A, lote 01, Sala AT07/66
Bairro: CEILÂNDIA SUL (CEILÂNDIA) **CEP:** 72.220-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-8434 **E-mail:** cep.fce@gmail.com

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar do projeto de pesquisa ANÁLISE SORO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS HUMANO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Rodrigo Haddad. Os herpesvírus humanos é uma família de vírus que podem infectar humanos a qualquer momento da vida através de fluidos contaminados e até mesmo através do transplante renal. Logo após a infecção alguns pacientes podem ter alguns sintomas e depois o vírus pode entrar em estado de latência (não se multiplica e não causa nenhum sintoma). Porém, em alguns indivíduos que possuem o sistema imunológico comprometido, pode ocorrer a reativação desses vírus, levando ao desenvolvimento de sintomas (febre, lesões de pele, pneumonias, entre outros), dependendo do tipo de herpesvírus que reativar. No caso de pessoas que passaram pelo transplante de rim, é necessário tomar medicamentos que evitem que o próprio sistema imunológico rejeite o rim recebido. Esses medicamentos fazem que o sistema imunológico fique um pouco comprometido, possibilitando a reativação dos herpesvírus e consequentemente a aparição de sintomas relacionados a esses vírus. Dentre eles, os que podem causar maiores problemas aos transplantados são: Citomegalovírus. Vírus Epstein Barr e os Herpesvírus tipo 6, 7 e 8. A descoberta da presença desses vírus poderá ajudar na implantação de protocolos de tratamento que ajude os pacientes que receberam o transplante de rim.

O objetivo desta pesquisa é avaliar a presença dos vírus Herpesvírus humanos que podem causar problemas importantes nos pacientes que passaram por transplante de rim.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a), com exceção do seu médico, que utilizará o resultado para lhe indicar o melhor tratamento.

A sua participação se dará por meio de doação de um tubo de sangue que será colhido no braço durante o momento em que você for fazer a coleta de sangue para seus exames de rotina. Como a colheita do sangue será realizada quando você for fazer seus exames de sangue, não haverá necessidade de ficar mais tempo no hospital, a não ser aquele tempo que você já ficaria para aguardar a coleta dos seus exames de rotina. Você não será submetido a nenhum procedimento adicional. Não haverá nenhum incômodo adicional caso aceite participar da pesquisa. O único incômodo será o da picada da agulha, ao qual você já se submeteria durante a coleta de sangue para realização de seus exames de rotina.

Há poucos riscos decorrentes de sua participação na pesquisa, como alguns casos de hematomas e sangramentos no local da punção. Para minimizar esse problema, as pessoas que fazem a coleta de sangue em seu braço farão a orientação de como proceder. No caso de hematoma, você deverá fazer compressas de gelo no local por 15 minutos durante as primeiras horas após a punção. No caso de sangramentos, você deverá a pressionar o local por um minuto com algodão e será fornecido pelo profissional um curativo para conter o sangramento. Se você aceitar participar, estará contribuindo para entender quais herpesvírus podem reaparecer em pacientes que tomam medicamentos para evitar a rejeição do rim recebido.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação, que será voluntária. Se existir qualquer despesa adicional relacionada diretamente à pesquisa (tais como, passagem para o local da pesquisa, alimentação no local da pesquisa ou exames para realização da pesquisa) a mesma será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília- Faculdade de Ceilândia podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Prof. Rodrigo Haddad, na Faculdade de Ceilândia no telefone 61 31078437 (laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ceilândia), disponível inclusive para ligação a cobrar. Pode tentar contato também pelo e-mail: haddad@unb.br.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia (CEP/FCE) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-8434 ou do e-mail cep.fce@gmail.com, horário de atendimento das 14h:00 às 18h:00, de segunda a sexta-feira. O CEP/FCE se localiza na Faculdade de Ceilândia, Sala AT07/66 – Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED) – Universidade de Brasília - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP: 72220-900.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável
Nome e assinatura (deve ser a original)

Brasília, ____ de ____ de ____.



Molecular characterization and frequency of human pegivirus type 1 (HPgV-1) in kidney transplant recipients from Central-West Brazil

Fábio Gonçalves da Silva¹ · Drielly Rodrigues Moura¹ · Pâmela Maria de Oliveira^{1,2} · Tatyane de Souza Cardoso Quintão^{1,2} · Évelin Mota Cassemiro^{1,2} · Gabriel Montenegro de Campos³ · Anielly Sarana da Silva³ · Rafael dos Santos Bezerra⁴ · Lorena Aparecida Gonçalves de Noronha⁵ · Walter Massa Ramalho^{1,5} · Wildo Navegantes de Araújo^{1,5,6} · Alex Leite Pereira^{1,5} · Svetoslav Naney Slavov^{3,7} · Rodrigo Haddad^{1,2,5,8}

Received: 28 November 2023 / Accepted: 9 August 2024

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2024

Abstract

Human Pegivirus Type 1 (HPgV-1), a ubiquitous commensal virus, has been recently suggested as a marker of immunologic function. There is scarce data for the presence, genotypes, and molecular characteristics of HPgV-1 among kidney transplant recipients. Therefore, the objective of this study was to examine the prevalence and the molecular characteristics (cycle threshold, genotypes) of this viral infection among kidney transplant recipients from the Brasília, Federal District of Brazil. HPgV-1 RNA detection in the plasma was assessed by RT-qPCR. Positive samples were submitted to sequencing and phylogenetic analysis of the 5'-UTR portion of the viral genome. The estimated HPgV-1 prevalence among renal-transplant recipients was 20%. The performed phylogenetic inference revealed that the most frequent genotype among these patients was HPgV-1 genotype 2 (78.9%) presented by its two subgenotypes (2 A and 2B), followed by genotypes 1 and 3 (10.5% each). This study presents new data about the HPgV-1 circulation and molecular characteristics among kidney transplant recipients from the Federal District of Brazil. Further work is fundamental to examine the effect of HPgV-1 among patients with immunological suppression, including kidney transplant recipients.

Keywords HPgV-1 · Kidney transplant recipients · Genotype · Frequency

Responsible Editor: Luis Augusto Nero.

✉ Rodrigo Haddad
haddad@unb.br

¹ Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District, Brasília, Brazil

² Molecular Diagnostics Laboratory, University Hospital of Brasília/EBSERH, Federal District, Brasília, Brazil

³ Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁵ Campus of Ceilândia, University of Brasília, Federal District, Brasília, Brazil

⁶ National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment, Porto Alegre, RS, Brazil

⁷ Butantan Institute, São Paulo, Brazil

⁸ Campus Universitário - Centro Metropolitano - DF, Ceilândia Sul, Brasília, DF CEP: 72220-275, Brazil

Introduction

Human Pegivirus Type 1 (HPgV-1), formerly known as GBV-C or hepatitis G virus, is a single-stranded positive RNA virus belonging to the *Pegivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The HPgV-1 genome contains approximately 9,400 nucleotides that encompass a single open reading frame (ORF) located between the untranslated regions (UTRs) at the 5' and 3' ends of the genome. The RNA translation results in the synthesis of a single polypeptide of approximately 3,000 amino acid residues which is cleaved into two structural proteins (envelope proteins E1 and E2) and six non-structural (NS) ones (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) [1]. Taxonomically, HPgV-1 is divided into seven genotypes that show specific geographic endemicity based on the phylogenetic analysis of the 5' UTR and E2 genomic regions of HPgV-1 [2].

Initially, the HPgV-1 was detected in patients suffering from acute hepatitis and was thought that is a cause of this

Published online: 21 August 2024

Springer

disease named therefore Hepatitis type G. However, the association with hepatic disease or other acute clinical condition in humans has not been proven over the years, and currently the scientific community believes that HPgV-1 is a commensal virus due to its widespread in the human population [3]. Studies indicate that approximately 750 million people worldwide are infected with HPgV-1. HPgV-1 is efficiently transmitted parenterally, sexually and vertically [4]. Therefore, higher prevalence is observed in individuals who have been submitted to multiple transfusions including high levels of parenteral exposure, human immunodeficiency virus (HIV-1), HCV (hepatitis C virus), and Hepatitis B virus (HBV) and in transplant recipients [5–8].

Recently, several studies have evaluated the presence of the HPgV-1 RNA as a co-infection with HBV, Ebola, and especially HIV [8–11]. In HIV-infected individuals, HPgV-1 viremia appears to be associated with better outcomes, such as reduced HIV viral load, better response to antiretrovirals, lower rates of vertical transmission, and slower progression to AIDS [10, 11]. It is believed that the better outcome in HIV-infected patients harboring HPgV-1 is due to immunomodulatory effects of the latter [10]. Some studies were conducted to observe whether these immunomodulatory events influence the outcome of the HPgV-1 infected kidney recipients, since these patients are submitted to specific immunosuppression schemes for graft maintenance [12, 13]. Until now, there is no association between HPgV-1 and transplantation outcome.

Although there are various studies about the influence of HPgV-1 on renal transplantation, there is no information about the HPgV-1 genotypes that circulate among patients with kidney transplantation. In our previous survey that used viral metagenomics to characterize the virome of kidney transplant recipients from Central-West Brazil, we observed a high abundance of sequence reads that belonged to HPgV-1. This raised serious concerns about HPgV-1 frequency and genotypes that circulate among patients submitted to renal transplantation.

Materials and methods

Kidney transplant recipients and sample collection

Between June 2018 and August 2021, 95 kidney transplant recipients (54 men and 41 women) treated at the University Hospital of Brasília, Federal District, Brazil (Fig. 1) were included in this study. Briefly, 5 mL of total blood was collected in EDTA sterile vacutainers (Vacuette, Greiner Bio-One, Americana, São Paulo, Brazil) and after low-speed centrifugation (1931×g, 10 min) the plasma was separated and stored at -80 °C until use. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Distrito Federal, Brazil (CEP-FCE/UnB, CAAE 83811718.8.0000.8093).

All participants provided signed informed consent forms before sample collection. Prior to transplantation and annually post-transplantation, all patients underwent testing for HIV and HCV. None of the patients included in this study were infected with HCV and/or HIV. Furthermore, viral metagenomic analysis revealed the absence of HIV, HCV, or HBV reads, reinforcing the absence of these infections among the patients. The investigation was initiated due to the notable abundance of HPgV-1 sequence reads observed in the viral metagenomics analysis. Initially, samples were subjected to viral metagenomics, which revealed a significant prevalence of HPgV-1 sequence reads in the majority of sample pools. Out of the 19 tested sample pools, 14 exhibited the presence of HPgV-1 sequence reads. This prompted a more detailed investigation into this viral agent within the patient group, particularly considering the limited data available in the Federal District of Brazil and globally. Subsequently, all individual samples that composed the pools were tested for the presence of HPgV-1 RNA by RT-qPCR and sequenced to study the viral genotypes.

Fig. 1 Geographic localization of the studied region from where kidney transplant recipients were recruited within Brazil and South America. Kidney transplant recipients treated at the University Hospital of Brasília, Federal District, Brazil were included in this study



Viral RNA extraction and HPgV-1 detection by RT-qPCR

Viral nucleic acids were automatically extracted using EXTRACTA Kit FAST-DNA and RNA Viral in EXTRACTA 32 equipment (Loccus, Brazil) following the manufacturer's instructions. HPgV-1 RNA was detected by RT-qPCR, applying the GoTaq® 1-Step RT-qPCR System kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) following the manufacturer's protocol. The cycling consisted of 1 cycle of reverse transcription (RT) for 40 min at 40°C; inactivation of Reverse Transcription (RT)/start of denaturation (1 cycle) for 2 min at 95°C; amplification for 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The following primers and probe corresponding to 5' UTR of the viral genome were used: RTG1 5'-GTGGTGGATGGGTGATGACA-3' (forward), RTG2 5'-GACCCACCTATAGTGGCTACCA-3' (reverse) and NFQ 5'-FAM-CCGGGATTACGACCTACC-3' (hydrolytic probe) [14].

Amplification of HPgV-1 5'-UTR by RT-nested PCR

After the confirmation of HPgV-1 positive samples, the 5'-UTR region of the virus genome was amplified for further genotyping. Initially, the reverse transcription (RT) was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription enzyme (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's recommendations using the primer GUTR.R01 (5'-AATGCCACCCGCCCTCA-3'). The nested-PCR protocol was adapted from previous studies [15, 16]. In brief, both rounds of nested-PCR were performed in a 50 µL reaction containing 5 µL cDNA (the first reaction product was used for the second round), 1 × PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 400 nM of each primer, 200 µM of dNTPs and 1.25U/reaction of recombinant Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil). For the first reaction, GUTR.F01, 5'-GGTTGGTAGGTCGTAAATCCCG-3' (forward primer) and GUTR.R01, 5'-AATGCCACCCGCCCTCA-3' (reverse primer) were used. For the second reaction, the GUTR.F02 5'-GTAGGTCGTAAATCCCGGTCA-3' (forward primer) and GUTR.R02 5'-CGAAGGATTCTTGGGCTACC-3' (reverse primer) were used. Nested-PCR reactions were performed in Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). For both rounds of nested-PCR the following protocol was used: denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s (40 cycles for second reaction), 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. A final extension at 72 °C for 10 min was used. The Nested-PCR products (379-nucleotide band) were detected by agarose gel (2.0%) electrophoresis stained with ethidium bromide

and visualized under ultraviolet (UV) illumination in an L-PIX TOUCH instrument (Loccus, São Paulo, Brazil).

Phylogenetic analysis of HPgV-1

The 5'-UTR sequencing was performed in the ABI 3500 XL DNA sequencer, using BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) with the following protocol: 95°C for 1 min for initial denaturation and 25 cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 4 min.

The obtained electropherograms were initially analyzed using BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA). For reference HPgV-1 sequences we obtained 71 complete genomes from the GenBank using the key words GBV-C, hepatitis G, Human pegivirus – 1 and complete genome. To align the sequences, we used MAFFT software [17] and the obtained alignment was manually edited using Aliview [18]. Maximum-likelihood trees were reconstructed using IQ-TREE software [19] with bootstrap support of 1,000 replicates. The most adequate substitution model was determined by using ModelFinder Plus (MFP). Finally, Figtree software was used for tree visualization and for phylogenetic signal analysis [20].

Statistical analysis

The online tool <http://www.winepi.net> was used to calculate the prevalence of HPgV-1 RNA found in our study and the estimated true prevalence considering the total number of kidney transplantations performed in the University Hospital of Brasília until August 2021. To do this, we considered the perfect sensitivity and specificity for the used diagnostic test for HPgV-1 RNA detection. Student's t-test was used to compare age mean and Fisher's exact test was used to compare HPgV-1 RNA prevalence between male and female.

Results

Blood samples were obtained from 95 kidney transplant recipients, of which 54 were male (56.8%) and 41 were female (43.2%) with a mean age of 45.3 years (± 14.1 years). The mean age was 47.5 (± 12.6 years) years for male and 43.2 (± 15.4 years) for female patients. No difference was observed between male vs. female mean age ($p = 0.1708$).

Initially, the samples were pooled (5 samples/pool) and evaluated by viral metagenomics. From 19 pools, 14 pools presented positivity for HPgV-1 RNA (unpublished data). Then, the positive pools (70 samples) were separately tested for HPgV-1 RNA by RT-qPCR. The estimated HPgV-1 frequency was 20% ($n = 19/95$, mean age 41.6, range ± 12.9).

Table 1 Studied population and HPgV-1 RNA prevalence

Gender	Male	Female	Total	Estimated true prevalence (CI: 95%) **
N	54 (56.8%)	41 (43.2%)	95 (100%)	-----
Age mean ($\pm$ SD)	47.5 ($\pm$ 12.6) ^a	43.2 ($\pm$ 15.4) ^a	45.3 ($\pm$ 14.1)	-----
HPgV-1 RNA +	7 (13%) ^b	12 (29.3%) ^b	19 (20%) [*]	13.1– 26.9%**
Age Mean ($\pm$ SD)	42.3 ($\pm$ 7.6) ^c	41.2 ($\pm$ 12.9) ^c	41.6 ($\pm$ 12.9)	-----

SD: Standard deviation; CI: confidence interval

*Apparent prevalence observed in this study

**Estimated true prevalence considering 352 kidney transplant recipients

^a Student's t-test: $p=0.1708$ ^b Fisher's exact test: $p=0.0695$ ^c Student's t-test: $p=0.8405$ **Table 2** Prevalence of HPgV-1 RNA by age groups and time after kidney transplantation

HPgV-1 RNA prevalence by age group	Results
18–29 years	3/16 (18.8%)
30–39 years	4/15 (26.6%)
40–49 years	6/21 (28.5%)
50–59 years	5/29 (17.2%)
> 60 years	1/14 (7.1%)
Total	19/95 (20%)
HPgV-1 RNA prevalence by time after kidney transplantation	Results
< 1 year	1/14 (7.1%)
1–3 years	6/24 (25%)
4–6 years	6/22 (27.3%)
7–9 years	6/27 (22.2%)
> 10 years	0/6 (0.0%)
NA	0/2 (0.0%)
Total	19/95 (20%)

*NA: not available

The positive samples presented a mean cycle threshold of 27.62 ($\pm$ 3.86). Despite the absence of statistical significance ($p=0.0695$), the prevalence of HPgV-1 RNA was higher in females compared to male kidney transplant recipients. The prevalence was 13% ($n=7/54$, mean age 42.3, range $\pm$ 7.6) in males and 29.3% ($n=12/41$, mean age 41.2, range $\pm$ 12.9) in females. The statistical evaluation demonstrated that the estimated true prevalence ranged between 13.1 and 26.9%, considering the total number of kidney transplantations performed at the University Hospital of Brasília until August 2021 (352 kidney transplantations). No statistical difference was observed between the mean ages of HPgV-1 RNA-positive male and female patients (Table 1).

The prevalence of HPgV-1 RNA by age group and time after kidney transplantation are shown in Table 2. To

evaluate the distribution of HPgV-1 RNA among the different age groups of the kidney transplant recipients, they were divided into five age groups: 18–29 years, 30–39 years, 40–49 years, 50–59 years, and > 60 years. The observed prevalence was 18.8% among the group with 18–29 years, 26.6% in the group of 30–39 years, 28.5% in the group of 40–49 years, 17.2% in the group of 50–59 years, and 7.1% in the group of > 60 years. We also evaluated the prevalence HPgV-1 RNA among the recipients with different time after kidney transplantation was evaluated. The recipients were divided into five different groups: < 1 year, 1–3 years, 4–6 years, 7–9 years and > 10 years after transplantation. The observed prevalence was 7.1% among the group with < 1 years, 25% in the group of 1–3 years, 27.3% in the group of 4–6 years, 22.2% in the group of 7–10 years, and 0.0% in the group of > 10 years after transplantation (Table 2).

The performed phylogenetic analysis demonstrated that the obtained sequences from 19 kidney transplant recipients from Central-West Brazil: were characterized as HPgV-1 genotypes 1, 2 and 3. As expected, the most prevalent genotype was 2, and it was represented by 15 positive samples (78.9%). Genotype 2 was presented with both subgenotypes 2 A and 2B. One sequence belonged to sub-genotype 2 A (1/19, 5.3%) and 14 sequences belonged to sub-genotype 2B (14/19, 73.6%). Interestingly, HPgV-1 presented at lower frequency in Brazil were also identified, once 2 samples belonged to genotype 1 (2/19, 10.5%) and 2 samples belonged to genotype 3 (2/19, 10.5%) (Fig. 2). Finally, the phylogenetic signal analysis demonstrated that only 13.5% of the taxa did not have their topologies grouped, indicating a strong phylogenetic signal (Fig. S1).

Discussion

In our study, where we estimated the frequency of HPgV-1 RNA among kidney transplant recipients from University Hospital of Brasília, Central-West Brazil, we detected an overall prevalence of 20% HPgV-1 RNA (estimated true prevalence between 13.1 and 26.9%). The prevalence in our cohort was in line with other studies that examined the HPgV-1 infection among Brazilian kidney transplant recipients, that is in Central-West Brazil (city of Goiânia), where the detected prevalence was 16.7% [21] and in Rio de Janeiro (southeastern Brazil) reporting a very high HPgV-1 RNA prevalence of 36.1% [13]. Additionally, few studies evaluated the prevalence of HPgV-1 RNA among kidney transplant recipients worldwide. Higher prevalences were observed in Turkey (42%) [22] and India (52.9%) [23], and similar prevalences were observed in Italy (24%) [24] and Spain (26.1%) [12] compared to the present study. We believe that the differences in the prevalence of HPgV-1

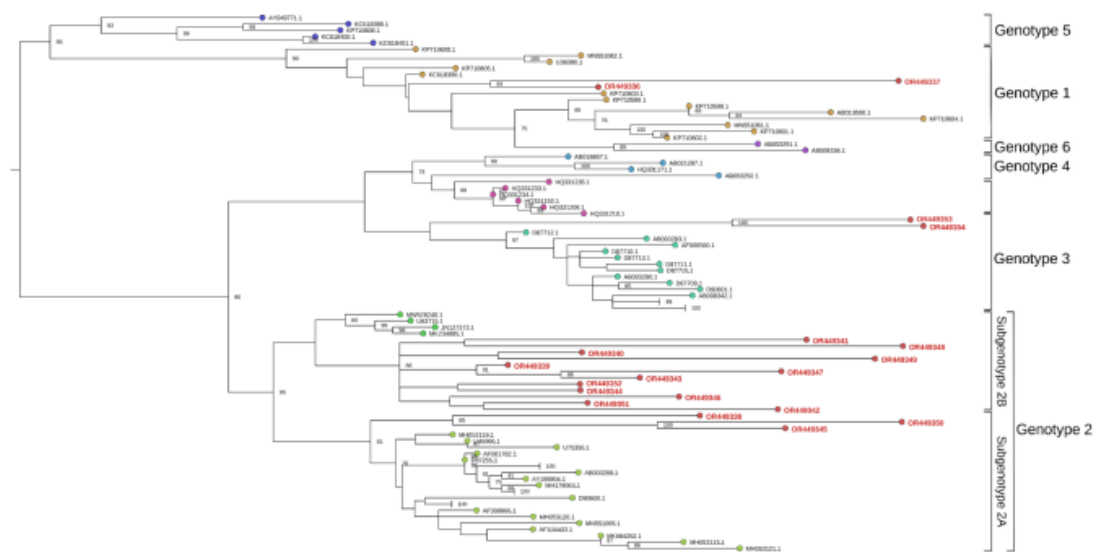


Fig. 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree of the 5'UTR region of the Human Pegivirus-1 (HPgV-1) obtained from kidney transplant recipients from Central-West Brazil. HPgV-1 isolated from kidney transplant recipients were characterized as genotypes 1 (2/19), 2 (1/19

sub-genotype 2 A and 14/19 sub-genotype 2B) and 3 (2/19). The HPgV-1 isolates detected in kidney transplant recipients are marked by red color and identified by the respective accession number in NCBI (OR449336 to OR449354)

may be explained by epidemiological variations (size and the clinical features of the patients), transmission routes, level of immunosuppression, living habits and sensitivity of the detection methods [21, 25].

On the contrary, studies that examine the HPgV-1 prevalence in other study groups showed lower values. For example, Brazilian studies that investigated the HPgV-1 prevalence among healthy blood donors showed lower prevalence which varied between 4.2% and 10% [15, 16, 26–29]. In general, the higher prevalence rates among kidney transplant recipients were expected due to two main reasons (i) high levels of parenteral exposure, such as previous hemodialysis and (ii) the levels of drug immunosuppression in these patients that maintain the functional characteristics of the transplanted kidney along life. In this regard, studies performed in South America showed HPgV-1 RNA prevalence rates varying between 12.8% and 17.6% in patients submitted to hemodialysis [21, 30–32].

We also observed a gradual increase of the HPgV-1 RNA prevalence which started with 21.4% in the age groups of 18–29 years and peaked in the group of 40–49 years (28.5%) with a gradual decrease in the group of 50–59 years (17.2%) and > 60 years (7.1%). These results are similar to the Brazilian studies, especially those investigating blood donors [15, 31]. Although the authors indicate that sexual activity influences this age distribution of prevalence for healthy blood donors, this conclusion cannot apply clearly

for kidney transplant recipients due the enhanced possibility of parenteral transmission. This is strengthened by the evidence that HPgV-1 RNA-positive recipients have higher intraoperative transfusion requirements and increased number of pre-transplant transfusions compared to HPgV-1 RNA-negative recipients [12].

The evaluation of the HPgV-1 infection kinetics demonstrated that the rate of HPgV-1 infection increased from 14.7% at pre-transplantation to 19.1% at 1-year post-transplantation [12]. Here, we observed that the prevalence rate of HPgV-1 RNA increased from 7.1% in patients with > 1-year post-transplantation to 25% in patients with 1–3 years post-transplantation. The prevalence rate remains higher in patients with 4–6 years (27.3%) and 7–9 years post-transplantation (22.2%), decreasing after 10 years. We are unaware if HPgV-1 RNA was already present in patients before transplantation and, therefore, it is impossible to guess if the respective patients had a previous HPgV-1 infection. However, the increasing prevalence within the post-transplantation period might be a result of infection obtained by the transplanted organ, received blood components or the presence of underlying low-level HPgV-1 infections due to the maintenance of immunosuppressive therapy. Current detection methods may not be effective in detecting an HPgV-1 infection with low-levels of replication [33] and the prevalence in the first-year post-transplantation may be higher than previously assumed.

The performed phylogenetic analysis showed the presence of three genotypes of HPgV-1 (genotypes 1, 2, and 3) in kidney transplant recipients from Central-West Brazil. The genotype 2 was the most frequently detected (15/19, 78%), with 1 specimen belonging to sub-genotype 2 A (5.3%) and 14 sequences belonging to sub-genotype 2B (73.6%). These results were expected, once the genotype 2 is the most frequently detected HPgV-1 genotype in Brazil in different patient groups like HIV-1 infected individuals [21, 29, 34], healthy blood donors [15, 16, 35–37], kidney transplant recipients [21, 38] and patients with fulminant hepatitis [38]. Additionally, HPgV-1 genotype 2 is the most prevalent one in European countries and the USA [39, 40].

At lower percentages, we also detected genotypes 1 and 3, with 2 specimens belonging to genotype 1 and 2 specimens belonging to genotype 3. Genotype 1 is identified predominantly in Africa [41, 42], while genotype 3 is endemic for Asian and Amerindian populations [43, 44]. Some Brazilian studies also detected, at lower prevalence, HPgV-1 genotypes 1 and 3 among blood donors [15], HIV-1 infected individuals [29] and kidney transplant recipients [21, 38]. We believe that the presence of HPgV-1 genotypes like 1 and 3 (rare for Brazil) might be related with the miscegenation of the country, where descendants of African and Amerindian origin are present.

Like any study, ours also exhibits several limitations, which are important to acknowledge as they may potentially influence the outcomes. These limitations encompass the restricted number of patients, who were sourced from a single center. Moreover, although we employed a genomic region traditionally utilized for HPgV-1 analysis, its size was relatively small. Consequently, acquiring complete HPgV-1 genomes is imperative for comprehending the molecular evolution of this viral agent among renal transplantation patients.

Conclusion

In our study, it was possible to observe a prevalence rate relatively close to other studies carried out in kidney transplanted recipients. Genotype 2 was the most frequent genotype (78.9%), followed by genotypes 1 and 3 (10.5% each), which corroborates other studies that point to genotype 2 as the most common genotype in Brazil. Many aspects of the HPgV-1 infection remain unclear, and we believe that other studies are necessary to examine the possible immunomodulatory functions of HPgV-1 among kidney transplant recipients and if this virus can influence the outcome of the kidney transplantation.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at [https://doi.org/10.1007/s42770-](https://doi.org/10.1007/s42770-024-01490-z)

024-01490-z.

Funding This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal, project numbers 00193–00000932/2019-14 and 00193–00000751/2021-11.

Declarations

Nucleotide sequence accession number The nucleotide sequences of HPgV-1 have been deposited in the NCBI database under accession number OR449336 to OR449354.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yu Y, Wan Z, Wang JH, Yang X, Zhang C (2022) Review of human pegivirus: prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. *Virulence* 13(1):324–341. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2029328>
2. Miao Z, Gao L, Song Y, Yang M, Zhang M, Lou J, Zhao Y, Wang X, Feng Y, Dong X, Xia X (2017) Prevalence and clinical impact of human Pegivirus-1 infection in HIV-1-Infected individuals in Yunnan, China. *Viruses* 9(2):28. <https://doi.org/10.3390/v9020028>
3. Santos Bezerra R, Santos EV, Maraninchi Silveira R, Silva Pinto AC, Covas DT, Kashima S, Slavov SN (2020) Molecular prevalence and genotypes of human pegivirus-1 (HPgV-1) and SENV-like viruses among multiply transfused patients with beta-thalassemia. *Transfus Apher Sci* 59(2):10269. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102697>
4. Samadi M, Salimi V, Haghsheenas MR, Miri SM, Mohebbi SR, Ghaemi A (2022) Clinical and molecular aspects of human pegiviruses in the interaction host and infectious agent. *Virol J* 19(1):41. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01769-3>
5. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1:564–569. <https://doi.org/10.1038/nm0695-564>
6. Marano G, Franchini M, Farina B, Piccinini V, Pupella S, Vaglio S, Grazzini G, Liumbruno GM (2017) The human pegivirus: a new name for an ancient virus. Can transfusion medicine come up with something new? *Acta Virol* 61:401–412. https://doi.org/10.4149/av_2017_402
7. Chivero ET, Stapleton JT (2017) Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. *J Gen Virol* 96:1521–1532. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000086>
8. Bhattarai N, Stapleton JT (2017) GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol* 20:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.004>
9. Lauck M, Bailey AL, Andersen KG, Goldberg TL, Sabeti PC, O'Connor DH (2015) GB virus C coinfections in west African Ebola patients. *J Virol* 89:2425–2429. <https://doi.org/10.1128/JVI.02752-14>
10. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, Ávila-Ríos S, García-Morales C, Reyes-Terán G, Escobedo G, Estrada G, García-Iglesias T, Muñoz-Saucedo N, Kershenovich D, Ostrosky-Wegman P, Ruiz-Palacios GM (2017) High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS ONE* 12(9):e0184494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184494>

11. Blackard JT, Ma G, Welge JA, Taylor LE, Mayer KH, Klein RS, Celentano DD, Sobel JD, Jamieson DJ, King CC (2017) Cytokine/chemokine expression associated with human pegivirus (HPgV) infection in women with HIV. *J Med Virol* 89(11):1904–1911. <https://doi.org/10.1002/jmv.24836>
12. Fernández-Ruiz M, Forque L, Albert E, Redondo N, Giménez E, López-Medrano F, González E, Polanco N, Ruiz-Merlo T, Parra P, San Juan R, Andrés A, Aguado JM, Navarro D (2022) Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: replication kinetics and clinical correlates. *Transpl Infect Dis* 24(1):e13771. <https://doi.org/10.1111/tid.13771>
13. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, Mello FCA, Varella RB, Soares CC (2020) Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: a single-center experience. *J Med Virol* 92(12):2961–2968. <https://doi.org/10.1002/jmv.25764>
14. Campos AF, Tengan FM, Silva SAA, Levi JE (2011) Influence of hepatitis G virus (GB virus C) on the prognosis of HIV-infected women. *Int J STD AIDS* 22:209–213. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2011.010283>
15. Slavov SN, Maraninchi Silveira R, Hespanhol MR, Sauvage V, Rodrigues ES, Fontanari Krause L, Bittencourt HT, Caro V, Laperche S, Covas DT, Kashima S (2019) Human pegivirus-1 (HPgV-1) RNA prevalence and genotypes in volunteer blood donors from the Brazilian Amazon. *Transfus Clin Biol* 26(4):234–239. <https://doi.org/10.1016/j.tracbi.2019.06.005>
16. Slavov SN, Silveira RM, Rodrigues ES, Diefenbach CF, Zimmermann AM, Covas DT, Kashima S (2019) Human pegivirus-1 (HPgV-1, GBV-C) RNA prevalence and genotype diversity among volunteer blood donors from an intra-hospital hemotherapy service in Southern Brazil. *Transfus Apher Sci* 58(2):174–178. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.01.002>
17. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
18. Larsson A (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30:3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
19. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
20. Rambaut A (2018) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
21. Filho RR, Carneiro MADS, Teles SA, Dias MJ, Cardoso DDP, Lampe E, Yoshida CFT, Martins RMB (2004) GB virus C/hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(6):639–643. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600019>
22. Erensoy S, Zeytinoglu A, Göksel S, Ozacar T, Ozkahya M, Ok E, Tuumlarkoglu S, Bilgiç A (2002) GB virus C/hepatitis G virus infection among renal transplant recipients in Izmir, Turkey: molecular analysis of phylogenetic groups. *Int J Infect Dis* 6:242–243. [https://doi.org/10.1016/s1201-9712\(02\)90121-9](https://doi.org/10.1016/s1201-9712(02)90121-9)
23. Abraham P, John GT, Raghuraman S, Radhakrishnan S, Thomas PP, Jacob CK, Sridharan G (2003) GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections among high risk renal transplant recipients in India. *J Clin Virol* 28:59–69. [https://doi.org/10.1016/s1201-9712\(02\)90121-9](https://doi.org/10.1016/s1201-9712(02)90121-9)
24. De Filippi F, Lampertico P, Soffredini R, Rumi MG, Lunghi G, Aroldi A, Tarantino A, Ponticelli C, Colombo M (2001) High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Dig Liver Dis* 33:477–479. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(01\)80025-6](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(01)80025-6)
25. Odeh RA, Yasin S, Nasrallah G, Babi Y (2010) Rates of infection and phylogenetic analysis of GB virus-C among Kuwaiti and Jordanian blood donors. *Intervirology* 53(6):402–407. <https://doi.org/10.1159/000317290>
26. Goubau P, Andrade FB, Liu H-F, Basilio FP, Croonen L, Barreto-Gomes VAF (1999) Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in north-eastern Brazil. *Tropical Med Int Health* 4:365–367. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00407.x>
27. Pinho JRR, Zanotto PMA, Ferreira JLP, Sumita LM, Carrilho FJ, Silva LC, Capacci ML, Silva AO, Guz B, Gonçalves FL Jr, Gonçalves NSL, Buck GA, Meyers GA, Bernardini AP (1999) High prevalence of GB virus C in Brazil and molecular evidence for intrafamilial transmission. *J Clin Microbiol* 37:1634–1637. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1634-1637.1999>
28. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, Fachini R, Wendel S (2003) High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45:75–78. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000200004>
29. Mota LDD, Finger-Jardim F, Silva CM, Germano FN, Nader MM, Gonçalves CV, Luque KYS, Chies JAB, Groll AV, Hora VPD, Silveira J, Basso RP, Soares MA, Martínez AMB (2019) Molecular and clinical profiles of human pegivirus type 1 infection in individuals living with HIV-1 in the Extreme South of Brazil. *Biomed Res Int* 2019:8048670. <https://doi.org/10.1155/2019/8048670>
30. Watanabe MA, Milanezi CM, Silva WA Jr, de Lucena Angulo I, Santis G, Kashima S, da Costa JA, Neto MM, Covas DT (2003) Molecular investigation of GB virus C RNA in hemodialysis and thalassemics patients from Brazil. *Ren Fail* 25:67–75. <https://doi.org/10.1081/jdi-120017469>
31. Lampe E, Saback FL, Yoshida CFT, Niel C (1997) Infection with GB virus C/hepatitis G virus in Brazilian hemodialysis and hepatitis patients and asymptomatic individuals. *J Med Virol* 52:61–67. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199705\)52:1<61::aid-jmv10>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199705)52:1<61::aid-jmv10>3.0.co;2-3)
32. Fernandez JL, Valtuille R, Hidalgo A, Del Pino N, Lef L, Rendo P (2000) Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients and its relationship with hepatitis C virus infection. *Am J Nephrol* 20:380–384. <https://doi.org/10.1159/000013620>
33. Graninger M, Aberle S, Görsch I, Jaksch P, Puchhammer-Stöckl E (2021) Human pegivirus 1 infection in lung transplant recipients: prevalence, clinical relevance and kinetics of viral replication under immunosuppressive therapy. *J Clin Virol* 143:104937. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104937>
34. Alcalde R, Nishiya AS, Casseb J, Inocencio L, Fonseca LA, Duarte AJ (2010) Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1 infected patients under antiretroviral therapy. *Virus Res* 151:148–152. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.04.008>
35. De Oliveira LA, Martins RMB, Carneiro MADS, Teles SA, Silva SA, Cardoso DDP, Lampe E, Yoshida CFT (2002) Prevalence and genotypes of GB Virus C/Hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97(7):953–957. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700005>
36. Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M, Niel C (1998) Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/Hepatitis G virus in Brazil. *J Med Virol* 56:39–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199809\)56:1<39::AID-JMV7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199809)56:1<39::AID-JMV7>3.0.CO;2-O)
37. Silva ASN, Silva CP, Barata RR, da Silva PVR, Monteiro PDJ, Lamarão L, Burbano RMR, Nunes MRT, de Lima PDL (2020) Human pegivirus (HPgV, GBV-C) RNA in volunteer blood donors from a public hemotherapy service in Northern Brazil. *Virol J* 17(1):153. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01427-6>

38. da Silva AS, de Campos GM, Villanova MG, Bezerra RDS, Santiago LMM, Haddad R, Covas DT, Giovanetti M, Alcantara LCJ, Elias MC, Sampaio SC, Kashima S, Slavov SN (2023) Human Pegivirus-1 detection and genotyping in Brazilian patients with fulminant Hepatitis. *Pathogens* 12:1122. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091122>
39. Kennedy N, Tong CY, Beeching NJ, Lamden K, Williams H, Mutton KJ, Hart CA (1998) Hepatitis G virus infection in drug users in Liverpool. *J Infect* 37(2):140–147. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(98\)80168-0](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(98)80168-0)
40. Neibecker M, Schwarze-Zander C, Rockstroh JK, Spengler U, Blackard JT (2011) Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J Med Virol* 83(4):685–694. <https://doi.org/10.1002/jmv.22029>
41. N'Guessan KF, Anderson M, Phinius B, Moyo S, Malick A, Mbangiwa T, Choga WT, Makhema J, Marlink R, Essex M, Musonda R, Gaseitsiwe S, Blackard JT (2017) The impact of human pegivirus on CD4 cell count in HIV-Positive persons in Botswana. *Open Forum Infect Dis* 4(4):ofx222. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx222>
42. Xiang J, Sathar MA, McLinden JH, Klinzman D, Chang Q, Stapleton JT (2005) South African GB virus C isolates: interactions between genotypes 1 and 5 isolates and HIV. *J Infect Dis* 192(12):2147–2151. <https://doi.org/10.1086/498170>
43. Yu ML, Chuang WL, Dai CY, Lu SN, Wang JH, Huang JF, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Tsai JF, Wang LY, Chang WY (2001) The serological and molecular epidemiology of GB virus C/hepatitis G virus infection in a hepatitis C and B endemic area. *J Infect* 42(1):61–66. <https://doi.org/10.1053/jinf.2000.0785>
44. Lee CK, Tang JW, Chiu L, Loh TP, Olszyna D, Chew N, Archuleta S, Koay ES (2014) Epidemiology of GB virus type C among patients infected with HIV in Singapore. *J Med Virol* 86(5):737–744. <https://doi.org/10.1002/jmv.23893>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.