

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Núcleo de Medicina Tropical

Tatyane de Souza Cardoso Quintão

**Vigilância molecular e metagenômica dos casos de síndrome
gripal no Distrito Federal, Brasil**

Brasília
2024

Vigilância molecular e metagenômica dos casos de síndrome gripal no Distrito Federal, Brasil

Tatyane de Souza Cardoso Quintão

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de doutora em Medicina Tropical.

Área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Coorientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira



Brasília

2024

dv de Souza Cardoso Quintão , Tatyane
Vigilância molecular e metagenômica dos casos de síndrome
gripal no Distrito Federal, Brasil / Tatyane de Souza
Cardoso Quintão ; orientador Rodrigo Haddad; co-orientador
Alex Leite Pereira. -- Brasília, 2024.
72 p.

Tese(Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de
Brasília, 2024.

1. Vigilância molecular. 2. Metagenômica. 3. Virus
respiratórios. I. Haddad, Rodrigo, orient. II. Leite
Pereira, Alex, co-orient. III. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Vigilância molecular e metagenômica dos casos de síndrome gripal no
Distrito Federal, Brasil

Data da defesa
12 de julho de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Haddad – Universidade de Brasília
(Presidente)

Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha – Fiocruz Bahia
(Banca externa)

Dr. Svetoslav Nanev Slavov - Instituto Butantan
(Banca externa)

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo - Universidade de Brasília
(Banca interna)

Prof. Dr. Diego Madureira de Oliveira – Universidade de Brasília
(Suplente)

Agradecimentos

A Deus, sem Ele nada seria possível, “[...] Deseje as coisas celestes, que sempre duram; [...] Quem a Deus tem, mesmo que passe por momentos difíceis; Nada lhe falta; Só Deus basta!” (Santa Tereza D’Ávila)

Aos meus pais, Kelly e Fernando, por todo apoio e incentivo;

À minha irmã, Wanessa, minha maior inspiração de força e resiliência;

Ao Fernando, meu esposo. Obrigada por ser meu equilíbrio; e à Ana Helena, nossa filha, que nem chegou e já me transformou de tantas maneiras.

Ao meu orientador, Rodrigo, por todas as oportunidades e confiança;

Ao meu coorientador, Alex, pela paciência, disposição e bom humor ilimitados;

À Pam Pam e a Évelin, por toda a ajuda com os ensaios e por tornarem os dias de trabalho mais leves;

À Wal, por sempre me incentivar e ser uma dose diária de alegria;

Ao Slav pelo treinamento para o preparo da metagenômica e por todas as contribuições;

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial: ao professor Wildo, Carolina, Priscila e Rafael.

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa de Jesus

Lista de figuras

	Página
Figura 01. Genoma viral e domínios funcionais do SARS CoV-2	19
Figura 02. Área espacial do estudo	33
Figura 03. Fluxograma descrevendo o processo de trabalho	34
Figura 04. Frequência de detecção de SARS-CoV-2 em pacientes atendidos com síndrome gripal por semana epidemiológica	42
Figura 05. Mapa de calor exibindo abundância absoluta de <i>reads</i> com classificação taxonômica dos vírus por amostras nasofaríngeas coletadas de pacientes sintomáticos com teste negativo para SARS-CoV-2.	45
Figura 06. Gráfico de amplificação referente a detecção de VSR (a) e Influenza (b) utilizando kit quadriplex	46
Figura 07. Frequência de detecção de VSR, FluA e coinfeções nas 52 semanas de atendimento	47
Figura 08. Detecção de CHIKV por metagenômica	48
Figura 09. (a) Proporção de amostras genotipadas, segundo semana epidemiológica. (b) Distribuição de amostras genotipadas, segundo semana epidemiológica	49

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Principais características das variantes SARS-CoV-2 que surgiram até o momento	21
Tabela 2. Características demográficas da população estudada	33
Tabela 3. Alvos específicos de cada variante e controle, Ta e concentração dos <i>primers</i> e marcação das sondas	36
Tabela 4. Primers e sonda utilizados para reação de CHIKV (LANCIOTTI et al., 2007)	41
Tabela 5. Quantidade de <i>reads</i> geradas pelo sequenciamento Illumina e porcentagem de <i>reads</i> classificadas como virais distribuídas entre os pools de amostras	44
Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos através da genotipagem e do sequenciamento	51

Lista de abreviaturas e siglas

ACE2 - Receptor da enzima conversora de angiotensina 2
CHIKV - Virus *Chikungunya*
covid-19 - Doença por coronavírus do ano 2019
DF - Distrito Federal
E – Envelope
ECSA - leste-centro-sul africana
FluAV - Influenza A
FluBV – Influenza B
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IDH - Índice de Desenvolvimento Humano
HA - Hemaglutinina
HAdV – Adenovírus humano
HRV – Rinovírus humano
M - Membrana
MERS-CoV - Síndrome respiratória do Oriente Médio
MS – Ministério da Saúde
N – Nucleocapsídeo
NA – Neuroaminidase
NEP – Proteína de exportação nuclear
NSP - Proteínas não estruturais
NTD - Domínio N-terminal
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF - Open read frame
RBD - Domínio de ligação ao receptor
RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S – Spike
SE - Semana epidemiológica
SG – Síndrome gripal

SRAG - Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 - coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

UBS – Unidade Básica de Saúde

VOC – Variante de preocupação

VOI - Variante de interesse

VSR - Vírus sincicial respiratório

Ta – Temperatura de anelamento

TMPRSS2 - Serina protease transmembrana tipo II

Órgãos financiadores

O projeto contou com financiamento do MEC/FUB/FM – Ações integradas de pesquisa e serviço para o enfrentamento da pandemia de covid-19 no Distrito Federal (número 23.106.028855/2020–74) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (Processo FAPDF - 00193–00000495/2020–72 e 193-00000751/2021-11).

Sumário

1.	Introdução	16
1.2	Síndrome gripal.....	16
1.3	COVID-19	17
1.4	Vírus sincicial respiratório	22
1.5	Influenza A e B.....	23
1.6	Cidade Estrutural	25
1.7	Vigilância genômica de SARS-CoV-2	26
1.8	Vigilância metagenômica	27
2.	Justificativa.....	30
3.	Objetivos	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4.	Materiais e Métodos	32
4.1	Seleção e coleta das amostras	32
4.2	Detecção do SARS-CoV-2.....	34
4.3	Genotipagem de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.....	35
4.4	Sequenciamento do gene Spike por Minlon	36
4.5	Transcrição reversa	36
4.6	Amplificação da biblioteca de sequenciamento	37
4.7	Purificação do produto de PCR e sequenciamento	37
4.8	Seleção e preparação das amostras para metagenômica e sequenciamento (Illumina).....	38
4.9	Análise de bioinformática	39
4.10	Ampliação da testagem por RT-qPCR para VSR e Influenza A e B.....	40
4.11	Detecção de vírus <i>Chikungunya</i> (CHIKV)	40
5.	Resultados	42
5.1	Detecção de SARS-CoV-2 em pacientes atendidos com síndrome gripal	42
5.2	Metagenômica de casos de síndrome gripal testados negativos para covid-19	43
5.3	Detecção de vírus sincicial respiratório (VSR) por RT-qPCR	45

5.4	Detecção de Vírus Chikungunya por metagenômica em amostras de nasofaringe	47
5.5	Genotipagem por RT-qPCR para determinação de variantes de SARS-CoV-2.....	48
5.6	Sequenciamento do gene Spike em amostras de SARS-CoV-2 genotipadas por RT-qPCR.....	49
6.	Discussão.....	52
7.	Conclusão	60
8.	Referências	61
9.	Apêndice	70

Resumo

Síndrome gripal (SG) é caracterizada por uma infecção respiratória aguda que frequentemente pode estar associada à presença de vírus respiratórios, principalmente, coronavírus, adenovírus, rinovírus e vírus sincicial respiratório. Em 2019, emergiu em Wuhan um novo coronavírus denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Com o nome oficial de covid-19, a infecção pelo SARS-CoV-2 rapidamente alcançou escala global se tornando uma pandemia e representando uma ameaça à saúde pública. Considerando que os sintomas das infecções por vírus respiratórios são muito semelhantes, este estudo tem por objetivo realizar a vigilância molecular e metagenômica de SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios, em amostras de pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde da Cidade Estrutural (DF). No período de março/2021 a março/2022, foram analisadas 2.695 amostras, sendo 832 (31%) casos positivos e 1.863 (69%) casos negativos para SARS-CoV-2. A metagenômica realizada em 320 amostras negativas para SARS-CoV-2, possibilitou a identificação de adenovírus, rinovírus, coronavírus 229E, coronavírus NL63 e surpreendentemente, vírus *Chikungunya*. A genotipagem das amostras positivas para SARS-CoV-2, através de RT-qPCR, possibilitou a identificação das principais variantes associadas aos picos de casos na Cidade Estrutural, além disso, através do sequenciamento de 76 amostras foi possível constatar 100% de concordância entre as técnicas. A vigilância de síndrome gripal possibilita identificar os principais vírus respiratórios em circulação, o que é fundamental para auxiliar no planejamento e adequação de medidas de prevenção e controle de infecções.

Palavras-chave: vigilância molecular; vírus respiratórios; metagenômica; SARS-CoV-2.

Abstract

Flu syndrome (FS) refers to an acute respiratory infection caused by the presence of respiratory viruses, including coronaviruses, adenoviruses, rhinoviruses, and respiratory syncytial viruses. At the end of 2019, a novel coronavirus emerged in Wuhan, known as SARS-CoV-2. Named covid-19, SARS-CoV-2 infection quickly spread globally, causing a pandemic and threatening public health. This study aimed to monitor SARS-CoV-2 and other respiratory viruses in samples from patients at the Cidade Estrutural Basic Health Unit (DF) by conducting molecular and metagenomic surveillance. Between March 2021 and March 2022, 2,695 samples were analyzed, with 832 (31%) testing positive for SARS-CoV-2 and 1,863 (69%) testing negative. Metagenomics of 320 negative samples revealed the presence of adenoviruses, rhinoviruses, coronavirus 229E, coronavirus NL63, and the Chikungunya virus. RT-qPCR genotyping of positive SARS-CoV-2 samples identified the main variants associated with peaks in the Cidade Estrutural, and sequencing confirmed the results. Monitoring flu syndrome is crucial for identifying the predominant respiratory viruses and implementing effective measures for preventing and controlling infections.

Key words: molecular surveillance; respiratory viruses; metagenomics; SARS-CoV-2.

1. Introdução

1.2 Síndrome gripal

Síndrome gripal (SG) é o termo utilizado para descrever um conjunto de sintomas que se assemelham aos da gripe, mas que ainda não possuem um agente causal estabelecido. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a síndrome gripal é caracterizada por infecção respiratória aguda com febre igual ou superior a 38 °C e tosse ou dor de garganta, com início de sintomas nos últimos 7 dias. A SG é classificada como infecção respiratória aguda grave quando ocorre a necessidade de hospitalização do paciente (FITZNER et al., 2018).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) classifica como SG o quadro clínico febril de início súbito, mesmo que referido, acompanhado de tosse ou dor de garganta com pelo menos cefaleia, mialgia ou artralgia, e na ausência de outro diagnóstico específico. A síndrome respiratória aguda grave (SRAG) inclui ainda dispneia ou insuficiência respiratória aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Estima-se que as infecções agudas respiratórias estejam associadas à mortalidade de 4,25 milhões de pessoas em todo o mundo (GRANDE AJ, KEOGH J, SILVA V, 2020).

As infecções, virais em especial, pandêmicas e epidêmicas representam uma séria ameaça à saúde global. Epidemias relevantes aconteceram nos anos de 2002 e 2012, causadas por dois coronavírus responsáveis pela síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em humanos. Ambos coronavírus de origem zoonótica e altamente patogênicos foram agentes do surgimento de doenças respiratórias fatais e se tornaram uma questão para a saúde pública (CUI; LI; SHI, 2019).

As principais pandemias incluem a de 2009 causada pelo vírus Influenza A (H1N1pdm09) e a covid-19 (do inglês – CoronaVirus Disease 2019 – doença por coronavírus do ano 2019) que tem como agente causal o SARS-

CoV-2. Além desses, outros vírus podem estar associados a surtos e epidemias como o vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus humanos (HAdVs) e rinovírus humanos (HRVs) (JEFFERSON T, 2020).

Alguns estudos apontam possível influência de determinantes sazonais nas epidemias por vírus respiratórios, como mudanças de temperatura, umidade, luz solar e fatores do hospedeiro como comportamento e imunidade. Fatores ambientais podem interferir na suscetibilidade do hospedeiro em virtude da modulação dos mecanismos de defesa das vias aéreas, o que afeta a viabilidade e transmissão dos vírus (MORIYAMA, MIYU; HUGENTOBLE, WALTER J; IWASAKI, 2020).

1.3 COVID-19

Coronavírus compreende um grupo diverso de vírus responsáveis por infecções respiratórias e intestinais em humanos e animais, com gravidade variada (WOO et al., 2012).

No fim de 2019, um novo coronavírus denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) emergiu na cidade de Wuhan, na China, e causou um surto de pneumonia viral. Caracterizada por alta transmissibilidade, a nova patologia foi nomeada oficialmente pela OMS como covid-19 e rapidamente se espalhou por todo o mundo. A rápida disseminação da covid-19 logo superou SARS-CoV e MERS-CoV tanto em termo de número de casos quanto em áreas epidêmicas afetadas. A covid-19 se tornou uma pandemia e uma ameaça global para a saúde pública. Após um período de pouco mais de três anos, no dia 05 de maio de 2023, a OMS anunciou o fim da covid-19 como uma emergência de saúde pública global. O impacto da pandemia ainda vem sendo explorado por diversos autores em diferentes áreas (DENG et al., 2020)(HUI et al., 2020)(LUO et al., 2023).

O SARS-CoV-2 possui características típicas da família coronavírus. Pertence ao gênero *Betacoronavirus* e apresenta 79% da sequência genômica idêntica ao SARS-CoV e 50% ao MERS-CoV (HU et al., 2020). É caracterizado por altas taxas de mutação e recombinações, o que resulta em

grande diversidade genética. As espécies de coronavírus 229E, OC43, NL63 e HKU1 são responsáveis, anualmente, por 10-30% das infecções de trato superior e estão associadas a doenças respiratórias leves. Em contrapartida, o SARS-CoV-2 é capaz de causar doença respiratória grave e potencialmente fatal (YANG; RAO, 2021). A disseminação da covid-19 ocorre através de contaminação por gotículas respiratórias, seja por tosse ou espirro ou através do contato com superfícies (GURUPRASAD, 2021).

No que concerne a filogenia e taxonomia, o SARS-CoV-2 foi classificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como um vírus da espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARSr-CoV), pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, reino *Riboviria* (GORBALENYA et al., 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 apresenta RNA fita simples sentido positivo e tamanho de aproximadamente 30 kb. São encontrados 14 quadros abertos de leitura (*Open read frames* - ORF's) que codificam as proteínas virais (GORDON et al., 2020). Na extremidade 5' do genoma ocorre sobreposição de duas ORF's (ORF1a e ORF1b), sendo que essas poliproteínas e os peptídeos codificados, denominadas pp1a e pp1ab, são clivados em 16 proteínas não estruturais (nsp1-nsp16) que estão envolvidas na transcrição e replicação do vírus (Fig.1) (DUBEY et al., 2021).

Na extremidade 3' do genoma, existem os genes que codificam outros 4 grupos de proteínas estruturais: proteínas do envelope (E), proteínas do nucleocapsídeo (N), proteínas da membrana (M) e proteínas *spike* (S). Ainda na extremidade 3', existem ORF's que codificam as proteínas acessórias (Fig. 1a) (DUBEY et al., 2021).

A proteína S é dividida em duas subunidades: S1 e S2. A subunidade S1 consiste em um domínio N-terminal (NTD) e um domínio de ligação ao receptor (RBD), responsável por reconhecer e interagir com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) da célula hospedeira. A subunidade S2 auxilia na fusão do envelope do vírus com as membranas das células hospedeiras (CHI et al., 2020).

A entrada do vírus na célula é mediada pela clivagem da proteína S no sítio S1/S2 pela furina - uma protease transmembrana ubíqua em todos os tipos celulares - e pela serina protease transmembrana tipo II (TMPRSS2) no sítio S2. O do sítio de clivagem S1/S2 é considerado elemento chave para propagação, infectividade e transmissibilidade do SARS-CoV-2 (Fig.1c)(DUBEY et al., 2021).

A proteína N se liga ao RNA viral formando o nucleocapsídeo e desempenha um papel fundamental no empacotamento do genoma e na replicação do vírus. A proteína M é responsável pela montagem das partículas virais. Por fim, a proteína E é considerada multifuncional e está associada à patogênese, montagem e formação do envelope de novas partículas virais (YADAV et al., 2021).

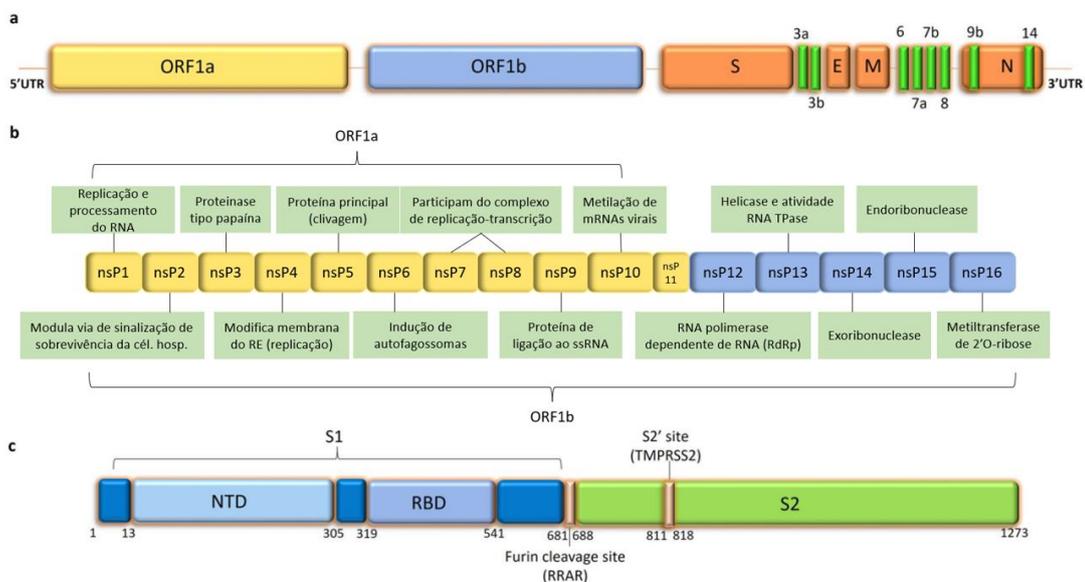


Figura 01. Genoma viral e domínios funcionais do SARS CoV-2. a. Esquema da estrutura genômica. O genoma é composto por 14 ORFs, responsáveis pela produção de proteínas estruturais e não estruturais (nsPs). b. A região n-terminal é traduzida gerando as poliproteínas pp1a e pp1ab, precursoras das nsp's. c. Representação esquemática dos domínios da proteína S. A subunidade S1 compreende o domínio n-terminal (NTD) e domínio de ligação ao receptor (RBD) (Adaptada de DUBEY et al., 2021).

O surgimento de novas variantes virais é considerado um evento esperado, uma vez que os vírus, em especial vírus de RNA, são submetidos a uma pressão evolutiva, o que faz com que o acúmulo de mutações seja um subproduto natural da replicação viral (LIPPI; MATTIUZZI; HENRY, 2022). Comparados com outros vírus de RNA, os coronavírus acumulam mutações a uma taxa consideravelmente menor, graças à atividade de exonuclease exercida pela nsp14. Tais mutações não são distribuídas de forma uniforme pelo genoma, estando desproporcionalmente localizadas no gene S (GERDOL; DISHNICA; GIORGETTI, 2022)(GERDOL; DISHNICA; GIORGETTI, 2022).

Segunda a OMS, uma variante é considerada de interesse (VOI) se, em comparação com a variante original, seu genoma contiver mutações que mudem o fenótipo do vírus e se tiver sido identificada como causadora de transmissão comunitária ou de múltiplos casos ou, ainda, se tiver sido detectada em vários países. Já uma linhagem viral é considerada como variante de preocupação (VOC) quando apresentar características como aumento da transmissibilidade, aumento da virulência ou mudança na apresentação clínica da doença, diminuição da eficácia das medidas de restrições sociais, das vacinas e das terapias disponíveis para controle da infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Desde o início da pandemia, múltiplas variantes de preocupação, como Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351); Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529), emergiram associadas à maior transmissibilidade e ao aumento da virulência (ALEEM; AKBAR SAMAD; SLENKER, 2021).

Na tabela 1 encontram-se as variantes de SARS-CoV-2 mais relevantes que surgiram, juntamente com suas principais características.

Tabela 1. Principais características das variantes SARS-CoV-2 que surgiram até o momento (Adaptado de LIPPI; MATTIUZZI; HENRY, 2022).

Variante	Denominação	Local	Data	Mutações na proteína Spike
B.11.7	Alpha (α)	Reino Unido	Dez, 2020	Δ 69-70, Δ Y144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H
B.1.351	Beta (β)	África do sul	Dez, 2020	L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V
B.1.1.128 (P.1)	Gamma (γ)	Brasil	Jan, 2021	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I
B.1.617.2	Delta (δ)	Índia	Maio, 2021	T19R, G142D, Δ E156, Δ F157, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N
B.1.427/9	Epsilon (ϵ)	Estados Unidos	Março, 2021	S13I, W152C, L452R
B.1.1.128 (P.2)	Zeta (ζ)	Brasil	Março, 2021	E484K, D614G, V1176F
B.1.525	Eta (η)	Nigeria	Março, 2021	Q52R, A67V, Δ 69-70, Δ 144, E484K, D614G, D677H, F888L
B.1.526	Iota (ι)	Nova Iorque	Nov, 2020	L5F, T95I, D253G, E484K, D614G, A701V
P3	Theta (θ)	Filipinas	Abril, 2021	Δ 141-143, E484K, N501Y, D614G, P681H
B.1.617.1	Kappa (κ)	Índia	Abril, 2021	E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H
C.47	Lamba (λ)	Peru	Dez, 2020	G75V, T76I, Δ 246-252, L452Q, F490S, D614G, T859N
B.1.621	Mu (μ)	Columbia	Jan, 2021	T95I, Y144S, Y145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H, D950N
B.1.1.529	Ômicron (\omicron)	África do Sul	Nov, 2021	A67V, Δ 69-70, T95I, Δ 142-144, Y145D, Δ 211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Embora para algumas dessas variantes as características clínicas e biológicas ainda não estejam completamente elucidadas, é válido ressaltar que para a grande maioria houve um aumento do potencial infectivo e de escape imunológico, mas não da patogenicidade. Isso mostra que as variantes de SARS-CoV-2 estão gradualmente se adaptando ao hospedeiro humano, buscando uma forma de equilibrar sua evolução e seus mecanismos de evasão e infectividade, sem necessariamente aumentar a patogenicidade e danos teciduais ao hospedeiro (LIPPI; MATTIUZZI; HENRY, 2022).

1.4 Vírus sincicial respiratório

O vírus sincicial respiratório humano (VSR) foi descoberto há mais de 60 anos (NAM; ISON, 2019). É considerado um dos principais agentes causadores de infecções do trato respiratório em adultos e crianças, tendo um potencial desfecho clínico negativo em crianças menores de dois anos, idosos e pacientes imunocomprometidos. É a principal causa de internação por doenças respiratórias em menores de 5 anos, comumente durante o primeiro ano de vida e em quase todos os casos em menores de 2 anos (FREITAS; DONALISIO, 2016).

As manifestações clínicas são de amplo espectro podendo variar desde uma infecção leve do trato respiratório superior, até infecções de trato respiratório inferior, como bronquiolite e pneumonia viral (PERK; ÖZDIL, 2018).

Em climas temperados, o VSR exibe um padrão de incidência sazonal, aparecendo principalmente durante o inverno. No hemisfério Sul, entre março e junho e no hemisfério norte, entre setembro e dezembro. Como o Brasil é um país com grande extensão territorial, podem ser encontradas diferenças na sazonalidade, segundo região (OBANDO-PACHECO et al., 2018).

Globalmente, estima-se que o VSR seja responsável por 33 milhões de casos de infecções de trato respiratório inferior em crianças menores de 5 anos, resultando em aproximadamente 3,2 milhões de internações e 120 mil

mortes. VSR é considerado um vírus ubíquo, com distribuição relativamente homogênea em todo o mundo (MEJIAS A et al 2020).

O VSR pertence ao gênero *Orthopneumovirus* e à, recém criada, família *Pneumoviridae*. São divididos em dois grupos antigênicos, A e B, que podem co-circular durante a mesma estação, mesmo que em proporções diferentes e apresentar divergências genéticas, de até 50%, que residem dentro da proteína G (NAM; ISON, 2019).

VSR é um vírus envelopado de RNA fita simples com polaridade negativa. O genoma apresenta 10 genes que codificam 11 proteínas. Três não estruturais, denominadas NS1, NS2 e M2-2 e oito estruturais. Dentre as proteínas estruturais, três são de superfície transmembrana (SH, G e F) e cinco são proteínas internas (N, P, M, M2-1 e L). As proteínas F e G são cruciais para a infectividade e patogênese do vírus (MEJIAS A et al 2020).

A transmissão ocorre através do contato direto com gotículas de secreção nasofaríngea emitidas por pessoas infectadas ou fômites. O vírus pode permanecer estável por várias horas em superfícies, sendo um agente importante de infecção nosocomial (NAM; ISON, 2019).

O diagnóstico pode ser realizado através de sorologia, teste de detecção de antígeno ou PCR. A sorologia (IgM e IgG) não é considerada clinicamente útil em adultos. O RT-qPCR é considerado padrão-ouro na detecção de vírus respiratórios devido à maior sensibilidade (84-100%) (BRANCHE; FALSEY, 2015)(NAM; ISON, 2019).

1.5 Influenza A e B

Influenza é uma doença respiratória infecciosa causada pelo vírus *Influenza*. Embora caracterizada por epidemias sazonais anuais, também ocorrem surtos pandêmicos globais esporádicos e imprevisíveis envolvendo cepas do vírus influenza A (JAVANIAN et al., 2021).

A pandemia de gripe espanhola de 1918 é considerada a pandemia mais fatal conhecida, com estimativa de mais de 50 milhões de mortes.

Somente na Índia estima-se entre 10 e 20 milhões de mortes. Outras pandemias seguiram-se com menor mortalidade e morbidade nos anos de 1957 (gripe asiática), 1968 (gripe de Hong Kong) e 2009 (gripe suína) (JESTER; UYEKI; JERNIGAN, 2018). Apesar dos avanços no diagnóstico, desenvolvimento de vacinas e antivirais, a ameaça de uma nova pandemia está sempre presente à medida que novas cepas de Influenza A de origem aviária ou suína vão surgindo (DHARMAPALAN, 2020).

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, são vírus envelopados e de RNA segmentado fita simples sentido negativo. Existem quatro gêneros descritos: *Influenza A*, *B*, *C* e *D*. O genoma dos vírus da Influenza A (FluAV) e B (FluBV) apresentam oito segmentos de RNA que codificam as subunidades de RNA polimerase, as glicoproteínas virais (hemaglutinina – HA; e neuroaminidase – NA), a nucleoproteína viral, as proteínas de matriz (M1) e de membrana (M2) e as proteínas não-estrutural (NS1) e de exportação nuclear (NEP) (KRAMMER et al., 2018).

As proteínas HA e NA são as mais antigenicamente variáveis, e no caso do FluAV são classificadas em diferentes subtipos. Essas proteínas estão localizadas na superfície viral e auxiliam na entrada e liberação do vírus, além de serem os principais alvos dos anticorpos induzidos pela vacinação. Cada isolado é nomeado de acordo com seu tipo ou gênero, hospedeiro e local de isolamento, número de isolados e ano de isolamento (KRAMMER et al., 2018).

A transmissão ocorre de pessoa para pessoa através de espirros e/ou tosse. As vias de transmissão mais importantes são contato direto com indivíduos infectados ou com objetos contaminados (JAVANIAN et al., 2021).

Os sintomas variam desde uma infecção do trato respiratório superior leve, caracterizada por febre, tosse, dor de garganta, coriza, cefaleia, dor muscular e fadiga, até sintomas mais graves como pneumonia, podendo ser letal em alguns casos (DHARMAPALAN, 2020).

O diagnóstico é feito frequentemente de forma clínica e laboratorial. Os métodos laboratoriais incluem principalmente o teste rápido e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Em situação de epidemia, a maioria dos casos é diagnosticada de forma clínica (JAVANIAN et al., 2021).

A vacinação é uma das melhores medidas para prevenir a infecção. A proteção individual e populacional depende da cobertura vacinal e da cepa circulante. Os vírus da Influenza são capazes de evadir da resposta imune mediada por anticorpos induzida pela vacina através do acúmulo de mutações nas proteínas HA e NA, em um processo conhecido por deriva antigênica. Esse processo faz com que sejam feitas atualizações constantes nas cepas que compõem a vacina e reforça a importância da vigilância das cepas circulantes (KRAMMER et al., 2018).

1.6 Cidade Estrutural

A Cidade Estrutural está localizada, no Distrito Federal (DF), a cerca de 20 km da região central e administrativa de Brasília, o Plano Piloto. A cidade se desenvolveu em torno de um aterro sanitário que ficou conhecido por “Lixão da Estrutural”. Os catadores que trabalhavam no aterro começaram a instalar suas moradias próximo ao local, e ao longo do tempo o número de famílias que residiam cresceu significativamente, atingindo cerca de 700 famílias em 1994. Hoje, há uma população estimada em aproximadamente 40.000 habitantes (SANTOS et al., 2020)(CRUVINEL et al., 2020).

Atualmente a Cidade Estrutural possui o menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Distrito Federal e no momento, existem 10 equipes de saúde da família e apenas um centro de atenção básica para atendimento à saúde da população (CRUVINEL et al., 2019). O valor médio da renda domiciliar por pessoa, em 2021, era de R\$695,40 e cerca de 29,8% concluíram o ensino médio completo (CODEPLAN, 2021).

A relação entre desigualdades sociais e doenças infecciosas (como tuberculose e influenza) já é amplamente discutida na literatura e alguns estudos já evidenciam que pode haver relação entre variáveis socioeconômicas, como o IDH, e maior número de casos, gravidade dos sintomas e mortalidade por covid-19 (VIEZZER; BIONDI, 2021)(GALVAN et al., 2020).

1.7 Vigilância genômica de SARS-CoV-2

O pilar de qualquer medida de prevenção e controle é a vigilância epidemiológica. O termo vigilância consiste na coleta sistemática, análise, interpretação e divulgação de dados acerca de um evento relacionado à saúde, que possibilitem fundamentar decisões e ações de saúde pública (IBRAHIM, 2020).

Com a expansão da epidemia de covid-19, as análises em tempo real dos dados epidemiológicos se mostraram indispensáveis para rápida conscientização e intervenção imediata. Essas análises são capazes de lançar luz sobre aspectos como gravidade, transmissibilidade, período infeccioso e de incubação (SUN; CHEN; VIBOUD, 2020).

A identificação de casos suspeitos ou confirmados é um elemento chave da vigilância epidemiológica, uma vez que possibilita monitorar a disseminação da doença a fim de identificar os padrões de progressão e a aplicação de medidas preventivas e de controle (WHO, 2020).

Apesar dos esforços para melhorar a vigilância, os países em desenvolvimento ainda têm dificuldade em identificar, diagnosticar e relatar doenças infecciosas com precisão (PRIETO et al., 2017). Na América do Sul, a vigilância da gripe e de outros vírus respiratórios carece de consistência e é inespecífica, particularmente em áreas mais remotas. Nessas áreas, muitas vezes, a vigilância é limitada pela escassez de equipe, recursos e infraestrutura (PRIETO et al., 2017). Somado a isso, a emergência do SARS-CoV-2 causou um grande impacto na vigilância de outros vírus respiratórios, uma vez que muitas de suas manifestações clínicas são compartilhadas (CHOTPITAYASUNONDH et al., 2021).

Dentro do escopo de vigilância epidemiológica encontra-se a vigilância genômica que tem sido vital para detecção oportuna de mutações, monitoramento da evolução do vírus e avaliação do grau de semelhança entre as variantes circulantes e as cepas utilizadas nas vacinas (CHEN et al., 2021).

Vários estudos têm utilizado dados genômicos para avaliar a evolução e disseminação de variantes dominantes em países ou regiões específicas, o que permite um levantamento rápido de informações e auxilia na tomada de decisão em relação a medidas de contenção (CHEN et al., 2021). Nesse contexto, o sequenciamento do genoma viral é essencial para o manejo de surtos, pois permite a determinação da origem e o monitoramento dos padrões de transmissão viral (DENG et al., 2020). Além disso, o rastreamento de mutações virais é importante para o desenvolvimento de novas vacinas e atualização dos sistemas de diagnóstico (DURMAZ; ABDULMAJED; DURMAZ, 2020).

1.8 Vigilância metagenômica

A metagenômica surgiu como um método capaz de revolucionar a identificação de agentes conhecidos e novos. Ao invés de realizar múltiplos ensaios direcionados, utilizando primers e sondas específicos, a técnica permite caracterizar qualquer DNA ou RNA presente na amostra, possibilitando análise de todo microbioma e levando à identificação de vários patógenos em um único ensaio, sem a necessidade de cultura (MILLER et al., 2013)(CHIU; MILLER, 2019).

Há décadas, abordagens metagenômicas têm sido aplicadas em áreas ambientais e humanas. Podem ser utilizados diversos tipos de amostras de solo, rios, oceanos, esgoto, plasma, swab nasofaríngeo, líquido, urina, fezes e até mesmo de amostras provenientes de ambientes hospitalares, como filtros de ar condicionado (CHIU; MILLER, 2019).

As aplicações envolvem diversas áreas como agricultura, ciências forenses e diagnóstico clínico. A técnica permite revelar o tipo e abundância de espécies, além de fornecer informações sobre a capacidade metabólica e potencial funcional de organismos presentes em um ambiente (LEMA; GEMEDA; WOLDESEMAYAT, 2023). A metagenômica aplicada ao estudo dos vírus tem grande potencial e pode permitir uma maior compreensão da história natural dos vírus, sua presença ou ausência e mecanismos de

integração/lise, identificação de possíveis relações virais com saúde e doença ainda não descritas (SANTIAGO-RODRIGUEZ; HOLLISTER, 2020).

Em estudo recente, com o objetivo de demonstrar a discrepância entre o número de pesquisas direcionadas ao microbioma em relação ao viroma, foram feitas duas buscas utilizando essas duas palavras como palavras-chaves. Foi observado um número notavelmente menor de estudos de viroma, o que foi atribuído a alguns desafios do estudo com vírus, incluindo menor tamanho, alta diversidade estrutural e genômica, falta de um gene universal passível de sequenciamento (SANTIAGO-RODRIGUEZ; HOLLISTER, 2020). Dentro desse contexto, a metagenômica viral tem o potencial de otimizar as pesquisas, auxiliar no diagnóstico de doenças e se tornar uma ferramenta de vigilância para a saúde animal, comunitária e global (CHIU; MILLER, 2019).

Apesar da ampla aplicabilidade e potencial, a utilização da metagenômica enfrenta muitos desafios. Por ser um processo com várias etapas, diversos vieses podem ser introduzidos desde a coleta das amostras até a análise dos resultados. A enorme quantidade de dados gerados é um dos grandes desafios, a análise requer alto poder computacional e conhecimentos avançados em bioinformática (LEMA; GEMEDA; WOLDESEMAYAT, 2023)

Os sistemas de diagnóstico e vigilância devem evoluir de forma contínua para que a identificação de novos agentes virais possa ser realizada de forma ágil possibilitando a tomada de decisões em saúde pública. Nesse contexto, a aplicação de uma técnica que não busca um alvo específico, como a metagenômica, pode ser de grande valia (KO; CHNG; NAGARAJAN, 2022). A exemplo disso, a técnica permitiu identificar a circulação de um arenavírus, conhecido como vírus sabiá (SABV), um vírus que não era identificado no Brasil há mais de 20 anos. O caso ocorreu em São Paulo em dois pacientes suspeitos de febre amarela grave. O diagnóstico só foi possível graças a utilização da metagenômica viral (NASTRI et al., 2022).

Sintomas gripais de forma geral, como febre, dor de cabeça, tosse, fadiga, mialgia, artralgia e diarreia, podem estar associados à infecção por SARS-CoV-2 mas também por outros vírus como influenza, rinovírus, vírus

sincicial respiratório e outros coronavírus (MOHAMADIAN et al., 2020)(NAM; ISON, 2019). No ano de 2023, segundo informe epidemiológico do MS, em quase 60% dos casos de SRAG hospitalizados não houve identificação do agente causal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A vigilância metagenômica em amostras negativas para SARS-CoV-2 é uma ferramenta que permite a identificação de outros vírus responsáveis por síndromes gripais e o monitoramento de patógenos emergentes descartando possíveis surtos que possam ocorrer concomitante à pandemia com o intuito de proteger a população (ALONSO; TAMERIUS; FREITAS, 2020)(KO; CHNG; NAGARAJAN, 2022).

2. Justificativa

A Cidade Estrutural apresenta o maior índice de vulnerabilidade social do Distrito Federal, e é considerada uma região precária no que concerne às questões sociais, econômicas e ambientais. A dificuldade de acesso aos serviços de saúde contribui para que medidas de prevenção e proteção sejam negligenciadas. A vigilância de agravos na região pode ter um papel norteador para ações de atenção e assistência e pode auxiliar no planejamento de estratégias de intervenção que visem a promoção e proteção da saúde da população.

A vigilância de síndrome gripal na região permite avaliar a epidemiologia de agentes virais circulantes. A utilização da metagenômica possibilita a identificação de outros agentes virais, por vezes não esperados, possibilitando o delineamento de ações de saúde para evitar, e até mesmo combater, um eventual surto. Além disso, o monitoramento sistemático das mutações no genoma permite a identificação de variantes circulantes e o surgimento ou chegada de uma nova variante, possibilitando assim, a observação da epidemiologia molecular do vírus.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Realizar a vigilância molecular e metagenômica para monitoramento de SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios, em amostras de pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde da Cidade Estrutural (DF).

3.2 Objetivos específicos

- Monitorar o número de casos de covid-19 na Cidade Estrutural;
- Detectar por metagenômica outros agentes virais em amostras negativas para covid-19;
- Validar os resultados encontrados na metagenômica por PCR em tempo real;
- Avaliar a sazonalidade de vírus relacionados à síndrome gripal;
- Identificar as principais variantes de SARS-CoV-2 circulantes.

4. Materiais e Métodos

4.1 Seleção e coleta das amostras

Foram selecionados para o estudo pacientes com quadro de síndrome gripal que procuraram atendimento na Unidade Básica de Saúde (UBS) da Cidade Estrutural (DF) (Figura 2 e tabela 1). Os pacientes foram entrevistados, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM/UnB, CAAE 39.892.420.7.1001.5558; CAAE 0.557.020.6.3001.5553) e Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS/SES/DF, CAAE 40.557.020.6.3001.5553) e tiveram amostra de swab nasofaríngeo coletada. O estudo se iniciou em março de 2021 e se estendeu por 52 semanas epidemiológicas, permitindo avaliação da sazonalidade das infecções virais respiratórias ao longo de um ano.

Para a coleta, foi utilizado 1 swab de rayon, inserido nas duas narinas com movimentos rotatórios. Seguido à coleta, o swab foi inserido em um tubo contendo meio de transporte viral (VTM) - Laborclin.

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Diagnóstico Molecular do Hospital Universitário de Brasília para realização do teste diagnóstico molecular por RT-qPCR para SARS-CoV-2.

Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C. As amostras positivas para SARS-CoV-2 com valor de Ct menor que 30 foram selecionadas para genotipagem e sequenciamento do gene Spike; as negativas foram selecionadas para análise metagenômica.

A figura 3 descreve o fluxo de trabalho que foi aplicado.



Figura 2. Área espacial do estudo. A Cidade Estrutural é delimitada pela Floresta Nacional de Brasília, que é uma área de proteção ambiental de 423,6 km² caracterizada pelo bioma Cerrado, e Cabeceira do Valo, caracterizada pela produção familiar de hortaliças.

Tabela 2. Características demográficas da população estudada.

	Sexo		Total
	Feminino	Masculino	
N	1688 (62,6%)	1007 (37,3%)	2695 (100%)
Idade em anos (M ± DP)	36.0 (13.0)	35.0 (13.0)	36.0 (13.0)

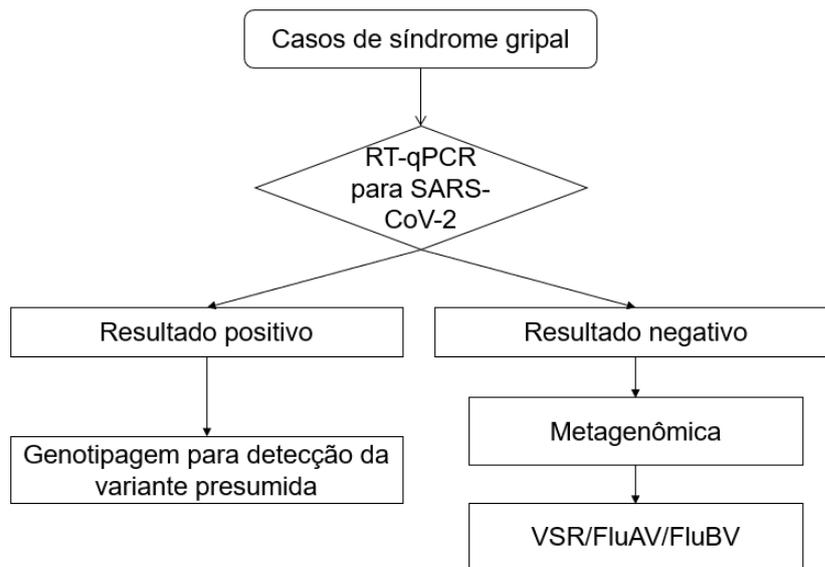


Figura 03. Fluxograma descrevendo o processo de trabalho.

4.2 Detecção do SARS-CoV-2

Para a detecção de SARS-CoV-2 foi realizada a extração automatizada de ácidos nucleicos, a partir de 100 μL de VTM, utilizando o kit para extração e purificação EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral (MVXA-P016FAST - LOCCUS, São Paulo, Brasil) e o sistema automatizado EXTRACTA 32 (LOCCUS). O RNA viral foi detectado por transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR - Kit Molecular SARS-CoV-2 (EDx) - Bio-Manguinhos). As reações foram realizadas em volume final de 15 μL , sendo 5 μL de amostra (produto da extração), 7,8 μL de mistura de PCR e 2,2 μL de mix Mix E/RP contido no kit diagnóstico, de acordo com as instruções do fabricante (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). As reações foram realizadas utilizando QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de acordo com as seguintes condições: 45°C por 15 min para a transcrição reversa, 95°C por 2 min para desnaturação, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguidos de 58°C por 30 segundos. As reações foram consideradas positivas para SARS-CoV-2 quando o Ct foi menor que 40. Para

reações de genotipagem o Ct considerado máximo aceitável foi de 30 e para o sequenciamento o Ct máximo considerado foi de 22. As amostras negativas foram utilizadas para a análise metagenômica.

4.3 Genotipagem de SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Para reação de genotipagem foram utilizadas amostras positivas com Ct < 30. Todas as amostras positivas do período referido de 52 semanas epidemiológicas foram genotipadas. Foram utilizados primers e sondas para identificação das seguintes variantes: gama, alfa, delta e ômicron, além de *primers* para controle da reação. Os alvos específicos de cada variante e controle, temperatura de anelamento (Ta) e concentração dos *primers* e sondas e marcação das sondas estão descritos na tabela 1.

As reações utilizaram o sistema GoTaq Probe 1-StepRT-qPCR System (Promega, USA) e os seguintes volumes: 10µL de master mix (2x), 0,4µL de enzima GoScript RT (50x), 0,5µL de *primer forward* e *reverse* de cada alvo, 0,5µL de sonda do alvo, 0,7µL de *primer forward* e *reverse* do controle interno, 0,5µL de sonda do controle, 1,2 µL de água RNAase free e 5 µL de RNA. As reações foram realizadas utilizando QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de acordo com as seguintes condições: 45°C por 5 minutos para transcrição reversa, 95°C por 3 minutos para desnaturação, 40 ciclos com temperatura específica de capa par de *primers* (tabela 3) por 45 segundos.

Tabela 3. Alvos específicos de cada variante e controle, Ta e concentração dos *primers* e marcação das sondas

Variante	Target	Ta dos <i>primers</i>	Marcação da Sonda	Solução de Uso
Gama	ORF1ab SGD del – F; R; Probe	60 °C	FAM-NFQ-MGB	[10µM]
Gama	ORF8 28263ins - F; R; Probe	57 °C	FAM-NFQ-MGB	
Delta	ORF8 del120:121 - F; R; Probe	59 °C	CY5-NFQ-MGB	
Alfa	SPIKE Y144del - F; R; Probe	63 °C	FAM-NFQ-MGB	
Alfa	SPIKE 6970del - F; R; Probe	48 °C	FAM-NFQ-MGB	
Controle	N1-Control - F; R; Probe	48-60 °C	TAMRA-NFQ-MGB	
Ômicron	ORF1ab S2083del - F; R; Probe	60°C	CY5-NFQ-MGB	
Ômicron	SPIKE G142D - F; R; Probe	60°C	FAM-NFQ-MGB	

4.4 Sequenciamento do gene Spike por Minlon

Para a realização do sequenciamento do gene Spike de SARS-CoV-2, reações de transcrição reversa foram realizadas com *primers* randômicos usando o kit M-MLV-RT RNase minus (Promega) seguindo especificações do fabricante. Reações de PCR para amplificação da biblioteca de sequenciamento foram realizadas com conjunto de *tiling primers* 21 a 26 do protocolo Midnight 1200, utilizando DNA polimerase de alta fidelidade (Pfu Polimerase - Promega). A biblioteca foi preparada para o sequenciamento utilizando o sistema de *barcode* SQK-RBK110.96 (Oxford Nanopore) seguindo instruções do fabricante, conforme melhor detalhado nos subitens 4.4.1 a 4.4.3.

4.5 Transcrição reversa

Para a reação de transcrição reversa foi utilizada a M-MLV Transcriptase Reversa, RNase H Minus (Promega, USA). Primeiramente, 6µL

de RNA e 4µL de *random primers* [12,625µM] foram misturados e incubados a 65°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 4µL de Buffer M-MLV RT 5x, 1µL de dNTP [10mM], 1µL de enzima M-MLV RT [200U/µL] e 4µL de água livre de nucleases. O programa no termociclador foi de 25°C por 5 minutos, 50°C por 50 minutos e 80°C por 10 minutos.

4.6 Amplificação da biblioteca de sequenciamento

Para a PCR foi utilizada a Pfu DNA polimerase (Promega, USA) e os *primers* 21, 22, 23, 24, 25 e 26 do protocolo Midnight (Oxford Nanopore). Os *primers* foram separados em dois *pools*: *pool A* (*primers* 21, 23 e 25) e *pool B* (*primers* 22, 24 e 26) e as reações foram realizadas de forma separada. Para a reação foram utilizados os seguintes volumes: 2,5µL de *buffer* 10x Pfu DNA polimerase, 0,5µL de dNTP [10mM], 3µL de *pool* de *primers* [10µM], 0,75µL de Pfu polimerase [2U/µL] e 15,75µL de água livre de nucleases. O programa utilizado foi o seguinte: 95°C por 1 min, 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 1 min e 73°C por 4 min, 73°C por 5 min e 4°C ∞.

4.7 Purificação do produto de PCR e sequenciamento

Previamente à purificação, o *pool B* foi adicionado ao *pool A*. A purificação das amostras foi realizada utilizando kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System (Promega, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas com Nanodrop™ UV-Vis Spectrophotometer.

A ligação dos *barcodes* foi realizada com 5µL de amostra (*set pool A + B*), 2,5µL de água livre de nucleases, 2,5µL de *rapid barcode*. A reação foi incubada em termociclador a 30 °C por 3 minutos e 80°C por 2 minutos.

Após a ligação dos *barcodes*, todas as amostras foram adicionadas a um tubo de 1,5 mL e purificadas utilizando *beads* magnéticas, em uma proporção de 1:1. A solução foi agitada no vórtex, em baixa velocidade, durante 5 minutos. O tubo foi colocado em uma estante magnética até a

formação do pellet de *beads*. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado com etanol fresco 80% durante 30 segundos. O etanol foi retirado e somente prosseguiu-se quando o tubo estava seco e sem nenhum resíduo aparente de etanol. O tubo foi retirado da estante magnética, e em seguida foi adicionado 30µL de tampão de eluição e incubado em termobloco por 10 minutos a 25°C. O tubo foi novamente posicionado na estante magnética e a biblioteca purificada foi recolhida em um novo tubo de 1,5 mL.

A ligação dos adaptadores foi feita com 11µL da biblioteca purificada e 1µL de *rapid adapter*.

Para carregar a *flow cell*, primeiramente, foi preparado o *priming mix*, com 30µL de *flush tether* e 1,17mL de *flush buffer*. Foram adicionados 800µL de *priming mix* pela *priming port* e aguardou-se 5 minutos. Nesse meio tempo, preparou-se a biblioteca com 25,5µL de *loading beads II*, 37,5µL de *sequencing buffer II* e 12µL da biblioteca. Com o *SpotOn* aberto, foram adicionados 200µL de *priming mix* pelo *priming port* e 75µL da biblioteca previamente preparada. Fechou-se o *SpotOn* e a *priming port* e iniciou-se o sequenciamento.

O *basecalling*, a demultiplexação e a remoção dos adaptadores das sequências foram realizados utilizando o programa MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies) e a sequência de referência: cepa original isolada em Wuhan (NC_045512.2). Os arquivos gerados foram concatenados em um único arquivo FASTQ e analisados utilizando Genome Detective.

4.8 Seleção e preparação das amostras para metagenômica e sequenciamento (Illumina)

Para realização da metagenômica foram utilizadas amostras negativas para SARS-CoV-2. No total, foi feita a preparação de 40 pools, sendo 2 pools por semana epidemiológica, compreendendo o período da semana epidemiológica (SE) 10 até a semana 29 de 2021. Cada pool foi constituído por 8 amostras. A seleção foi feita de forma a permitir amostragem de toda a semana.

Inicialmente, 600µL do meio contendo swab foram pré-tratados com Turbo DNase (kit Turbo DNA-free, ThermoFisher Scientific, São Paulo, Brasil) para a remoção de DNA hospedeiro/bacteriano livre. Após a inativação da DNase, 8 amostras individuais foram agrupadas em pools. Os pools de amostra foram extraídos utilizando o High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Além disso, os ácidos nucleicos de cada pool de amostra foram concentrados usando o transportador GenElute™ Linear Polyacrylamide (LPA) (Merck, São Paulo, Brasil). Após a extração, os ácidos nucleicos virais foram recuperados em água pré-aquecida a 70°C em água livre de nuclease e submetidos à transcrição reversa usando o Superscript III First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific, São Paulo Brasil). A amplificação do cDNA foi realizada por meio do QuantiTect Whole Transcriptome Kit (QIAGEN, São Paulo, Brasil). As bibliotecas de sequências foram preparadas usando o Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, EUA) e Nextera DNA CD Indexes seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento das bibliotecas indexadas duplas foi realizado utilizando-se sequenciador do sequenciador Illumina NVSEQ 6000 e do kit NextSeq High Output v 2.5, 300 ciclos (Illumina, San Diego, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

4.9 Análise de bioinformática

Os dados da sequência bruta obtidos foram submetidos à análise de controle de qualidade por meio do software FastQC v.0.11.88. Após esta etapa, foi realizado o recorte para selecionar as sequências com a melhor qualidade. O corte foi realizado aplicando Trimmomatic v.0.3.9, 9 e (ii) Cutadapt v. 2.410. Para a análise bioinformática foram utilizadas sequências com qualidade > 30 scores. Também foi realizado um corte adicional para melhorar a qualidade geral usando AfterQCsoftware v.0.9.711. Para inferir a classificação taxonômica, foi utilizado o programa Kraken2 v2.0.812. Para examinar a profundidade da cobertura das *reads* classificadas, foi utilizado o

software BWA v.0.6.13. A montagem “de novo” foi realizada usando SPAdes v.3.13.014 para gerar *contigs* e *scaffolds*. Finalmente, para realizar a classificação taxonômica com base na identidade da proteína, aplicamos o Blastx conforme implícito no software Diamond v.0.9.29.

4.10 Ampliação da testagem por RT-qPCR para VSR e Influenza A e B

Para confirmação de achados nos pools avaliados na metagenômica e para a ampliação de testagem para outros vírus respiratórios foi utilizado kit multiplex Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay da Seegene, seguindo instruções do fabricante.

4.11 Detecção de vírus *Chikungunya* (CHIKV)

No intuito de confirmar a presença do CHIKV, observado no ensaio de metagenômica, foi realizada a sua detecção por RT-qPCR, utilizando o sistema GoTaq Probe 1-StepRT-qPCR System (Promega, USA) e os seguintes volumes: 10µL de master mix (2x), 0,4µL de enzima GoScript RT (50x), 1,8µL de primer *forward* e *reverse*, 0,5µL de sonda e 5,5 µL de RNA. As reações foram realizadas utilizando QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de acordo com as seguintes condições: 45°C por 30 minutos para transcrição reversa, 95°C por 5 minutos para desnaturação, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os primers e sonda utilizados encontram-se na tabela 4. A árvore de máxima verossimilhança foi construída usando IQ-TREE v1.6.12 com suporte estatístico bootstrap de 1000 réplicas.

Tabela 4. Primers e sonda utilizados para reação de CHIKV (LANCIOTTI et al., 2007)

Primer	Sequência
CHIKV 6856	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA
CHIKV 6981	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC
CHIKV 6919-FAM	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG

5. Resultados

5.1 Detecção de SARS-CoV-2 em pacientes atendidos com síndrome gripal

O número total de pacientes atendidos com síndrome gripal (SG) e testados para covid-19, no período de um ano, foi igual a 2.695, sendo 832 (31%) casos positivos e 1.863 (69%) casos negativos para SARS-CoV-2. No ano de 2021, o aumento de demanda por atendimento devido à ocorrência de SG seguiu um padrão de oscilação. Observou-se um aumento expressivo de casos nas semanas epidemiológicas (SE) 11 e 12 (março). A partir da SE 17 (abril) verificou-se uma queda no número de casos, seguido de um aumento a partir da SE 37 (setembro). Vale destacar que na semana 52 (dezembro) houve um aumento significativo de casos de SG que não tiveram o SARS-CoV-2 como agente causal.

O ano de 2022 iniciou com alta demanda por atendimento, o número de casos de SG nas semanas 01 e 02 foi alto, sendo que somente 5% e 16% desses casos foram causados por SARS-CoV-2, respectivamente. As semanas 04 e 05 não foram avaliadas devido a uma interrupção nas coletas. Na SE 06 observou-se aumento de casos e a partir da SE 07 declínio, sendo esse um padrão que se manteve nas semanas 08 e 09, com um discreto aumento na SE 10 (Figura 04).

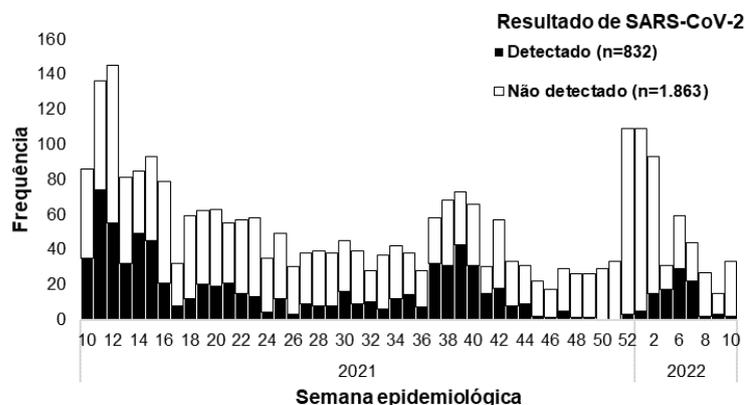


Figura 04. Frequência de detecção de SARS-CoV-2 em pacientes atendidos com síndrome gripal por semana epidemiológica.

5.2 Metagenômica de casos de síndrome gripal testados negativos para covid-19

Considerando que quase 70% dos pacientes atendidos com síndrome gripal apresentaram resultado negativo para SARS-CoV-2, foram selecionadas 320 amostras, que compuseram 40 *pools* de 8 amostras, para realização de metagenômica viral. Foram selecionadas 16 amostras por SE compreendendo vinte semanas, da SE 10 até 30 do ano de 2021, que corresponde ao período de março até julho.

O sequenciamento resultou em um número total de 541.861.104 *reads* dos 20 *pools* analisados. Uma média de 27 milhões de *reads* foram geradas por *pool* (intervalo: 20-35 x10⁶). Uma média de 0,014% (intervalo: 0,008-0,045%) das *reads* pertenciam a vírus (Tabela 5).

A figura 5 exibe a abundância absoluta de *reads* com a classificação taxonômica dos vírus por amostras nasofaríngeas. Os resultados foram expressos considerando a soma dos resultados de abundância de 2 *pools* por SE. VSR foi detectado em 10 semanas, com destaque na SE 14 (abril), semana com o maior número de *reads*, sua circulação compreendeu o período de março a maio. Os coronavírus 229E e NL63 foram detectados em 13 e 10 semanas, respectivamente, no período que compreende a SE 15 (abril) a 27 (julho). Foram detectadas *reads* de adenovírus e rinovírus em quase todas as semanas. E o CHIKV foi detectado em 2 *pools*, nas semanas 15 e 18 (Figura 05).

Tabela 5. Quantidade de *reads* geradas pelo sequenciamento Illumina e porcentagem de *reads* classificadas como virais distribuídas entre os *pools* de amostras

Pool	Semana Epidemiológica	Reads	Reads após corte	Reads Virais	Reads Virais (%)
1	Semana 10	27835510	24239770	2044	0,008
2	Semana 11	24890490	20568370	2878	0,014
3	Semana 12	28581460	26569240	2561	0,010
4	Semana 13	22392385	21745091	3512	0,016
5	Semana 14	28219935	26009245	4514	0,017
6	Semana 15	37715895	35649070	3772	0,011
7	Semana 16	24166238	21749614	3439	0,016
8	Semana 17	27727909	26064234	2446	0,009
9	Semana 18	24672155	21711496	2565	0,012
10	Semana 19	23234948	21840851	3750	0,017
11	Semana 20	26166628	23811631	2284	0,010
12	Semana 21	28646260	26068097	4651	0,018
13	Semana 22	30505241	28369874	12671	0,045
14	Semana 23	24374432	23155710	5177	0,022
15	Semana 24	28435996	27014196	3842	0,014
16	Semana 25	26793402	25453732	2816	0,011
17	Semana 26	29017902	26406291	3593	0,014
18	Semana 27	22671388	21537819	3211	0,015
19	Semana 28	27261787	30692372	3043	0,010
20	Semana 29	28551143	25981540	2567	0,010

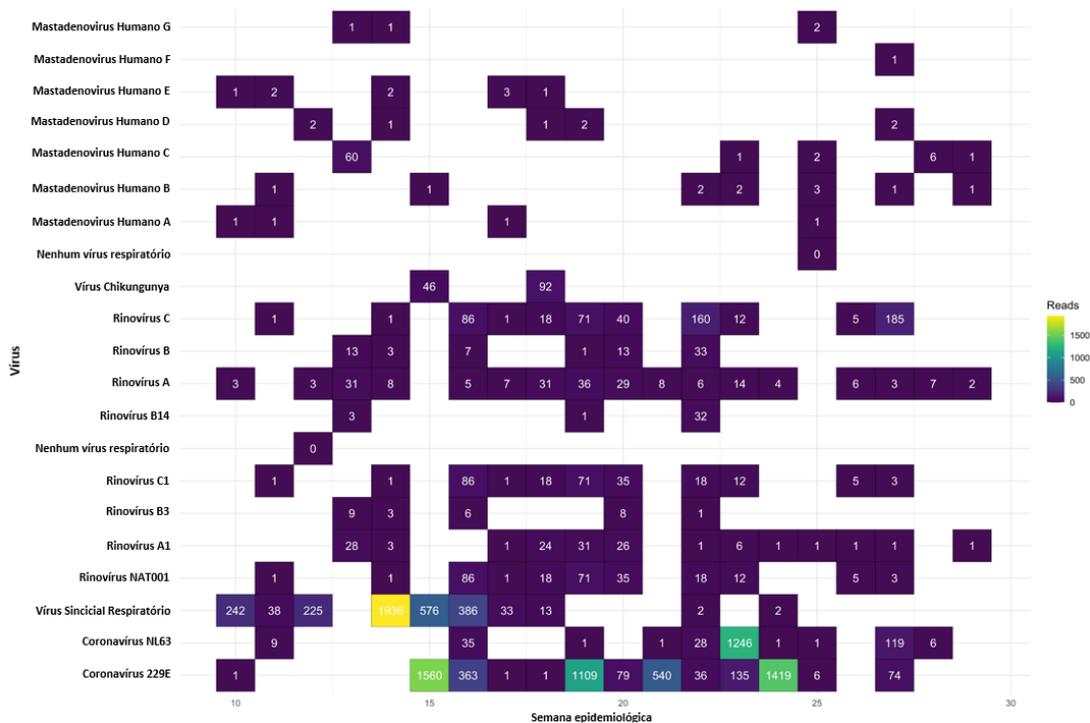


Figura 05. Mapa de calor exibindo abundância absoluta de *reads* com classificação taxonômica dos vírus por amostras nasofaríngeas coletadas de pacientes sintomáticos com teste negativo para SARS-CoV-2. Os resultados foram expressos considerando a soma dos resultados de abundância de 2 pools por SE.

5.3 Detecção de vírus sincicial respiratório (VSR) por RT-qPCR

Com o objetivo de confirmar os achados da metagenômica, identificando quais amostras dentro do pool eram positivas para VSR, foi realizada abertura dos 10 *pools* em que foram detectadas *reads* para esse vírus. Diante da observação que havia a circulação do VSR na população estudada, uma ampliação da testagem por RT-qPCR para 2.695 amostras colhidas durante o período do estudo foi realizada posteriormente, utilizado kit multiplex destinado à detecção de SARS-CoV-2, Flu A e B, e RSV A/B (Figura 07).

Em todos os 10 *pools*, foi encontrada pelo menos uma amostra positiva para VSR, totalizando 15 amostras. As curvas de amplificação estão representadas na figura 06. Com a ampliação da testagem e utilização de kit

de detecção quadríplice, foi possível identificar um pico de influenza A no final de 2021.

No período de 2021 (SE 10) a 2022 (SE 10), foi observado maior número de casos de SG causados por SARS-CoV-2 (30%), seguido por Influenza A (10%) e VSR (3%).

No início do ano de 2021, é possível observar o pico de casos de VSR (n=97), compreendendo as semanas 10 a 19, com alguns casos de coinfeção SARS-CoV-2 e VSR detectados nas semanas de 11 a 14 (6%). Na maior parte do ano predominou a circulação de SARS-CoV-2. A partir de SE 48, inicia a detecção de casos de Influenza A (FluAV) (n =274), com o pico nas semanas 52 e 01 de 2022. Há ocorrência de alguns casos de coinfeção SARS-CoV-2 e FluAV (3%) (Figura 07).

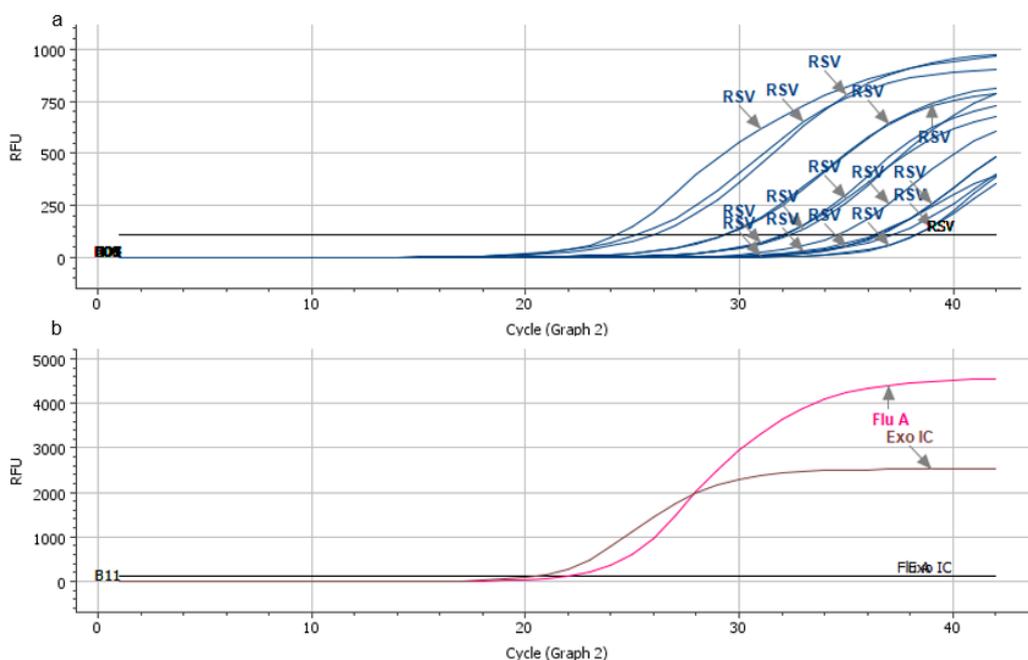


Figura 06. Gráfico de amplificação referente a detecção de VSR (a) e Influenza (b) utilizando kit quadríplice.

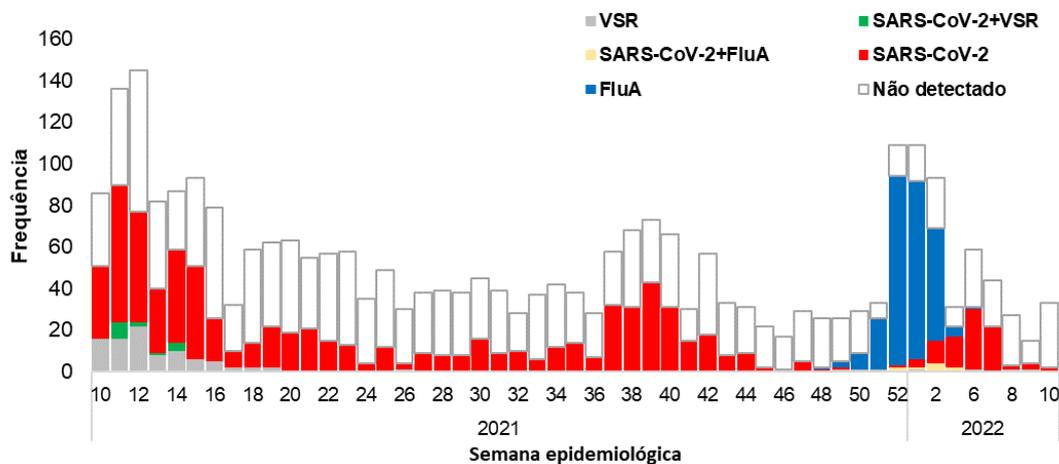


Figura 07. Frequência de detecção de VSR, FluA e coinfeções nas 52 semanas de atendimento.

5.4 Detecção de Vírus Chikungunya por metagenômica em amostras de nasofaringe

Como observado na figura 05, em dois *pools* foram detectadas *reads* de CHIKV. Nos *pools* de número 11 e 18, que representavam as semanas 15 e 18, respectivamente. Foi realizada RT-qPCR das 16 amostras que faziam parte dos *pools*, para identificação de quantas e quais amostras eram positivas para CHIKV. Foram detectadas 2 amostras positivas, uma cada em *pool*. As curvas de amplificação das duas amostras em ensaio de RT-qPCR estão representadas na figura 08 A. A partir das 46 *reads* encontradas no *pool* 11 e das 92 no *pool* 18, foi possível realizar a montagem dos *contigs* que resultaram em um tamanho de 655 e 718pb, respectivamente. A árvore filogenética construída mostrou 3 clados principais, correspondentes aos genótipos do CHIKV, asiático, leste-centro-sul africana (ECSA) e oeste africano. As amostras deste estudo agruparam no genótipo ECSA (Figura 08 B).

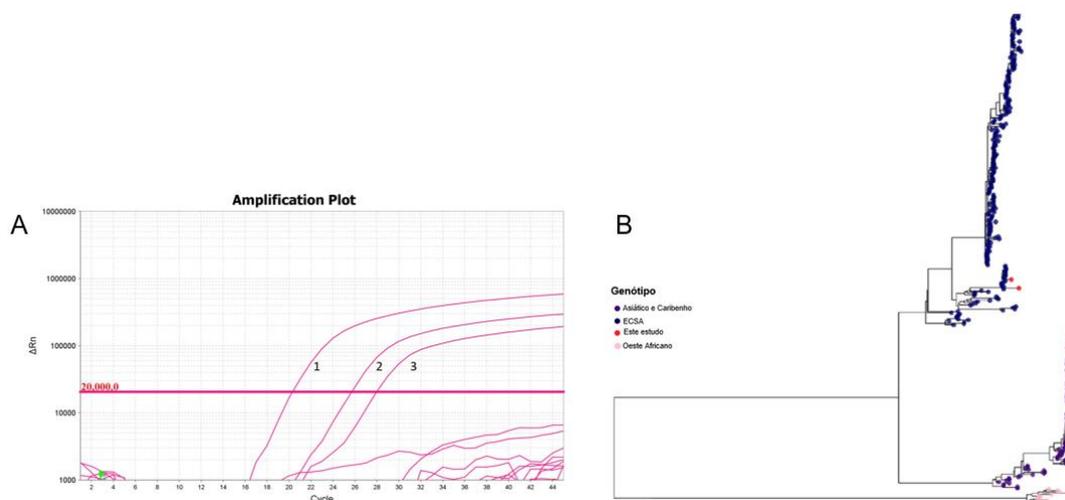


Figura 08. Detecção de CHIKV por metagenômica. (A) Gráfico de amplificação representativo da reação confirmatória de RT-qPCR mostrando o controle positivo do CHIKV (1), a amostra positiva do pool 18 (2) e a amostra positiva do *pool* 11 (3). (B) Árvore de máxima verossimilhança construída a partir dos *contigs* de CHIKV obtidos pela análise de metagenômica. Na reconstrução filogenética, foram utilizados 397 genomas completos de CHIKV obtidos do GenBank sob modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G4+F com suporte estatístico *bootstrap* de 1.000 réplicas.

5.5 Genotipagem por RT-qPCR para determinação de variantes de SARS-CoV-2

A genotipagem para identificação da variante presumida foi realizada por método de RT-qPCR. Do total de 832 amostras positivas para SARS-CoV-2, 574 amostras (68,9%) (todas que apresentaram Ct < 30) foram selecionadas para genotipagem (Figura 09a).

No ano de 2021, até a SE 30 somente a variante gama foi detectada. A partir da SE 31 (agosto), a variante delta passou a ser detectada e gradualmente se tornou predominante. É possível observar que a emergência de uma nova variante é acompanhada do aumento no número de casos de SARS-CoV-2. Na SE 50, a variante ômicron passou a ser detectada ocasionando um novo aumento do número de casos e predomínio de circulação da nova variante em detrimento da anterior (Figura 09b)

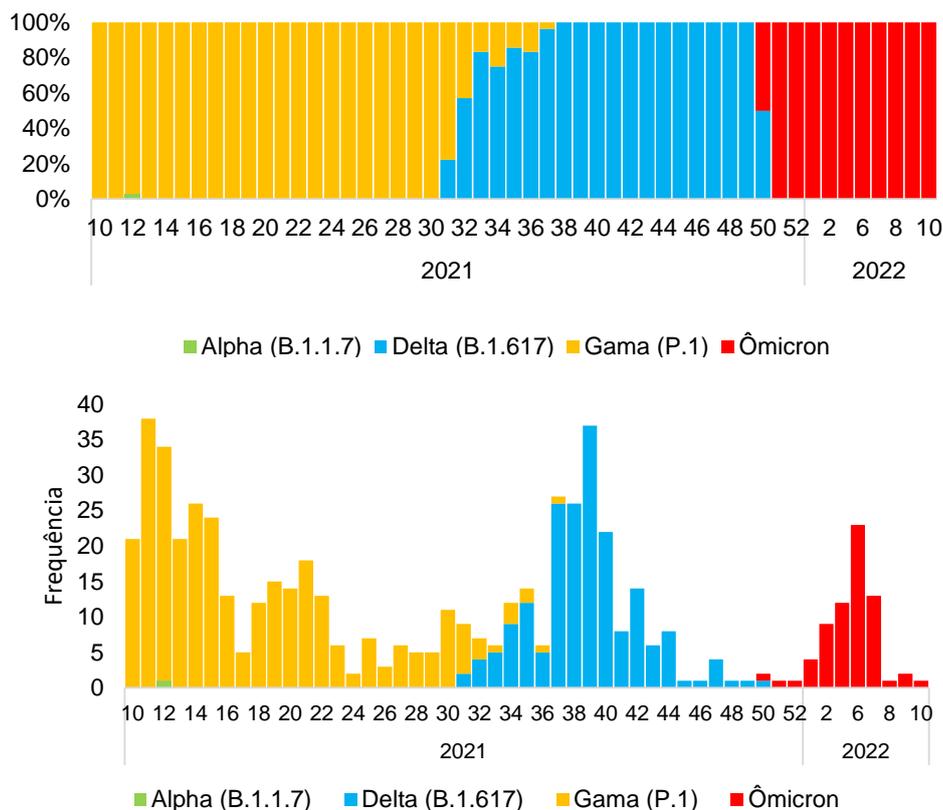


Figura 09. (a) Proporção de amostras genotipadas, segundo semana epidemiológica. (b) Distribuição de amostras genotipadas, segundo semana epidemiológica

5.6 Sequenciamento do gene Spike em amostras de SARS-CoV-2 genotipadas por RT-qPCR

Foram selecionadas 76 amostras positivas para SARS-CoV-2, apresentando Ct < 22, e que foram submetidas a ensaios de genotipagem por RT-qPCR. O sequenciamento do gene S foi realizado para avaliar a congruência dos resultados obtidos nos ensaios de genotipagem por RT-qPCR. A concordância entre a variante presumida na genotipagem e a variante identificada pelo sequenciamento foi de 100% (Tabela 6). O sequenciamento permitiu identificar a circulação de duas linhagens da variante Ômicron, BA.1 (detectada entre 11 a 19/1/22) e BA.1.1. (detectada entre 7/1 a 22/2/22) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos através da genotipagem e do sequenciamento.

Amostra	Resultado Genotipagem	Resultado Sequenciamento	Amostra	Resultado Genotipagem	Resultado Sequenciamento
0250vig	ALFA	ALFA	1410vig	GAMA	GAMA
1441vig	DELTA	DELTA	1413vig	GAMA	GAMA
1469vig	DELTA	DELTA	1417vig	GAMA	GAMA
1481vig	DELTA	DELTA	1432vig	GAMA	GAMA
1482vig	DELTA	DELTA	1433vig	GAMA	GAMA
1517vig	DELTA	DELTA	1435vig	GAMA	GAMA
1527vig	DELTA	DELTA	1436vig	GAMA	GAMA
1539vig	DELTA	DELTA	1438vig	GAMA	GAMA
1546vig	DELTA	DELTA	1442vig	GAMA	GAMA
1551vig	DELTA	DELTA	1449vig	GAMA	GAMA
1552vig	DELTA	DELTA	1459vig	GAMA	GAMA
1554vig	DELTA	DELTA	1472vig	GAMA	GAMA
1562vig	DELTA	DELTA	1477vig	GAMA	GAMA
1568vig	DELTA	DELTA	1485vig	GAMA	GAMA
1572vig	DELTA	DELTA	1499vig	GAMA	GAMA
1595vig	DELTA	DELTA	1521vig	GAMA	GAMA
1598vig	DELTA	DELTA	1571vig	GAMA	GAMA
1613vig	DELTA	DELTA	1573vig	GAMA	GAMA
1618vig	DELTA	DELTA	1600vig	GAMA	GAMA
1625vig	DELTA	DELTA	1628vig	GAMA	GAMA
1632vig	DELTA	DELTA	1646vig	GAMA	GAMA
1638vig	DELTA	DELTA	0660vig	GAMA	GAMA
1639vig	DELTA	DELTA	2465vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1642vig	DELTA	DELTA	2511vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1657vig	DELTA	DELTA	2519vig	OMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1664vig	DELTA	DELTA	2539vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1665vig	DELTA	DELTA	2563vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1)
1666vig	DELTA	DELTA	2564vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1)
1670vig	DELTA	DELTA	2568vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1677vig	DELTA	DELTA	2581vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1)
1680vig	DELTA	DELTA	2583vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)

Tabela 6. Comparação entre os resultados obtidos através da genotipagem e do sequenciamento (continuação).

Amostra	Resultado Genotipagem	Resultado Sequenciamento	Amostra	Resultado Genotipagem	Resultado Sequenciamento
1688vig	DELTA	DELTA	2585vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1689vig	DELTA	DELTA	2592vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
2111vig	DELTA	DELTA	2649vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
2132vig	DELTA	DELTA	2666vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
2133vig	DELTA	DELTA	2673vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
2148vig	DELTA	DELTA	2685vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1.1)
1407vig	GAMA	GAMA	2703vig	ÔMICRON	ÔMICRON (BA.1)

6. Discussão

Além de outros fatores, em razão da sua extensa área territorial, o Brasil apresenta ampla desigualdade social. Condições precárias de moradia, domicílios superlotados e falta de saneamento básico tendem a dificultar a adoção de medidas para contenção da propagação de agentes virais. Diante disso, populações vulneráveis estão mais expostas aos efeitos negativos de epidemias e pandemias (OLIVEIRA; ABRANCHES; LANA, 2020) e são desproporcionalmente mais afetadas por doenças infecciosas e crônicas (GRIEF; MILLER, 2017).

O crescimento populacional e ocupação desordenada, sobretudo em regiões de áreas florestais, propiciam maior contato das pessoas com a fauna silvestre, parasitas e vetores, o que torna essa população mais suscetível a doenças emergentes e reemergentes (TAZERJI et al., 2022). Nesse contexto, a aplicação de diferentes abordagens moleculares permite ampliar as formas de vigilância e gerar resultados que se complementam objetivando ações mais céleres, integradas e intersetoriais de vigilância em saúde (REGUAMANGIA, 2015).

O número de pacientes atendidos na UBS da Cidade Estrutural com SG e que apresentaram resultado negativo para SARS-CoV-2 foi de quase 70%, levantando suspeita sobre a circulação de outros agentes virais. Após a realização da metagenômica viral e quando testadas individualmente para VSR, Influenza A e CHIKV, a porcentagem de amostras negativas caiu para 55,2%. Essa porcentagem poderia ser ainda menor se as amostras tivessem sido testadas para adenovírus, rinovírus e coronavírus 229E e NL63, uma vez que foram identificadas *reads* desses agentes virais na metagenômica viral. Nos anos de 2022 e 2023, no DF, as porcentagens de SG com agente viral não especificado foram de 68,8% e 55,7%, respectivamente (SES/DF, 2023)(SES/DF, 2022). Se a política de vigilância fosse organizada de forma a se utilizar a metagenômica viral com a posterior confirmação de resultados com testes moleculares específicos, o número de casos de SG sem agente

etiológico identificado tenderia a uma redução, levando a uma melhor compreensão dos cenários epidemiológicos

A cocirculação comunitária de vírus respiratórios já era comum antes da covid-19. Apesar da mudança no cenário epidemiológico ocasionada pela pandemia, a circulação desses vírus ainda deve ser monitorada, uma vez que podem ser a causa importante e sazonal de morbidade e mortalidade em certos grupos etários (ACHANGWA et al., 2022). Nesse estudo, através da metagenômica viral, foi possível avaliar a presença dos vírus respiratórios que circularam na Cidade Estrutural, durante os meses de março a julho de 2021.

A detecção de coronavírus NL63 e 229E, adenovírus, Influenza, VSR e rinovírus era esperada posto que a cocirculação desses vírus é um evento característico, principalmente nos meses de inverno. No entanto, os picos de VSR e Influenza observados na Cidade Estrutural ocorreram nos meses de março/2021 (pico de VSR; SE 10 - 12), dezembro/2021 (pico de Influenza A; SE 51 e 52) e janeiro/2022 (pico de Influenza; SE 01 e 02), que são meses de verão. Essa mudança no cenário epidemiológico também se repetiu em outros países. Na Austrália foi observada uma redução de cerca de 98% na detecção de VSR e Influenza no inverno (YEOH et al., 2020). Na Europa, no início do inverno de 2020 foram registrados 33 casos de Influenza, um número bem abaixo dos 10.616 casos registrados no mesmo período do ano anterior (BINNS et al., 2022). O também reduzido número de hospitalizações por bronquiolite mostra que esses achados não são atribuídos somente à falta de diagnóstico laboratorial e endossam a mudança no padrão de circulação de VSR (BINNS et al., 2022). Vários autores demonstram que as medidas utilizadas para contenção da disseminação do SARS-CoV-2, como uso de máscara, lavagem regular das mãos, uso de álcool e distanciamento social acabaram afetando a disseminação de outros vírus respiratórios e provocando essa mudança nos períodos de maior transmissão e intensidade dos picos (KUMAR et al., 2022)(MOSSCROP; WILLIAMS; TREGONING, 2022)(LJUBIN-STERNAK et al., 2021).

Em relação aos casos de Influenza, o ano de 2021 foi marcado pela mudança sazonal dos casos. Segundo boletim epidemiológico da SES de 01

de março de 2022, no DF, houve um acentuado aumento do número de casos de Influenza A a partir da SE 51 de 2021 até SE 03 de 2022. Esse pico também foi observado na Cidade Estrutural e foi atribuído a circulação do subtipo H3N2. Em outros estados, como São Paulo e Sergipe, também foi registrado o aumento de casos de síndrome gripal por H3N2, no mesmo período (FAICO-FILHO; BARBOSA; BELLEI, 2022)(SANTOS et al., 2022).

A utilização da metagenômica viral como ferramenta epidemiológica permite não só uma maior compreensão da dinâmica de circulação dos vírus, mas também a identificação de agentes virais inesperados. De forma fortuita, foram detectadas *reads* de CHIKV em dois dos *pools* de amostras coletadas no período de pandemia de covid-19. A presença de CHIKV no *swab* pode ser atribuída ao amplo tropismo celular que o vírus apresenta, podendo infectar células endoteliais, epiteliais fibroblastos, entre outras (TRAVERSE et al., 2022).

Após a introdução da linhagem asiática de CHIKV nas Américas em 2013 e a subsequente detecção da linhagem leste-centro-sul africana (ECSA) em 2014, no nordeste do Brasil, mais de 2,9 milhões de infecções já foram relatadas no país. A análise filogenética permitiu identificar a circulação do genótipo ECSA na Cidade Estrutural, que é o genótipo mais comum no Brasil (DE OLIVEIRA et al., 2021).

O diagnóstico de CHIKV é usualmente feito utilizando soro ou plasma que são amostras que permitem realização de RT-qPCR e sorologia, aumentando a chance de detecção (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Até o momento, não existem outros relatos de detecção por metagenômica de CHIKV em amostra nasofaríngea coletada com *swab*. Contudo, há estudos mostrando saliva e urina como amostras alternativas bem sucedidas para detecção molecular de arbovírus (MUSSO et al., 2016)(MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Esse resultado reforça o potencial da metagenômica como ferramenta de vigilância e da utilização de amostras alternativas menos invasivas para caracterização de situação epidemiológica (NIEDRIG et al., 2018).

A pandemia de covid-19 apresentou um comportamento oscilante de transmissão conhecido por ondas. O pequeno volume populacional da Cidade Estrutural (cerca de 40.000 habitantes) possibilitou observar a propagação dos casos e a introdução e expansão de variantes na região. Analisando os resultados é possível observar 3 picos principais, o primeiro em março de 2021, logo no início do estudo, o segundo em setembro de 2021 e o terceiro em janeiro de 2022.

A variação no número de casos de covid-19 detectado pela vigilância da Cidade Estrutural acompanhou temporalmente as oscilações da taxa de transmissão ($R(t)$) detectadas pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF). A $R(t)$ representa o número médio de infecções secundárias que um indivíduo que está transmitindo a doença é capaz de gerar em um determinado tempo. O desejado é que essa taxa esteja abaixo de 1,0. O maior pico observado foi o primeiro de 2021 (SE 10 a 16) e foi provocado pela introdução da variante Gama, inicialmente conhecida como P.1. No DF, segundo boletim informativo da SES-DF, na SE 09 houve um aumento na taxa de transmissão ($R(t)$) chegando a 1,42, e duas semanas depois pudemos observar aumento de casos positivos na Cidade Estrutural. O segundo pico começou na SE 36 (setembro) e coincidiu com o aumento do número de casos e taxa de transmissão ($R(t)$ de 1,09) registrados no DF pela SES. Já no último pico de casos de covid-19 foi iniciado em janeiro de 2022 (SE 01 a 04), período no qual a SES-DF registrou a maior $R(t)$ do período analisado (2,61, no dia 20 de janeiro -SE 03). Na Cidade Estrutural o maior número de casos desse último pico foi observado na SE 06.

A intensidade dos picos foi decrescendo ao longo do tempo. No primeiro pico, observou-se maior número de pessoas com síndrome gripal procurando atendimento. Na SE 11 de 2021 foi registrado 54% de positividade para SARS-CoV-2, a segunda maior encontrada ao longo do ano avaliado. Na SE 11 de 2021 foi registrado 54% de positividade para SARS-CoV-2, a segunda maior encontrada ao longo do ano avaliado. Os demais picos foram caracterizados pelo número cada vez menor de atendimentos, mas não

necessariamente com menor positividade para SARS-CoV-2. Na semana 39 de 2021, já no segundo pico, foi registrada a maior positividade, de 58%.

As medidas de prevenção, tais como uso de máscaras, distanciamento social, e principalmente a vacinação contribuíram para diminuição da intensidade dos picos. Em populações vulneráveis, como da Cidade Estrutural, a vacinação é a medida mais importante e talvez a única que possa ser praticada efetivamente, considerando o cenário da região. A vacinação no Brasil foi iniciada no dia 17 de janeiro de 2021, com a importação de 6 milhões de doses de CoronaVac pelo Instituto Butantan (GIOVANETTI et al., 2022). Segundo informativo epidemiológico da SES-DF, e considerando a população-alvo de 18 anos ou mais, até o dia 01 de abril de 2021, 12,9% da população já havia recebido a primeira dose (D1) e 3,27% a segunda (D2). Em comparativo, durante o segundo pico, que se iniciou em na SE 39, setembro de 2021, a cobertura vacinal de D1 estava em 80,6% e de D2 em 42,7% para maiores de 18 anos. A vacinação de jovens de 12 a 17 anos teve início no dia 05 de agosto no DF e a cobertura de D1 estava em 50,1%. O terceiro pico, com início na SE 02 de 2023, foi o de menor intensidade e corrobora com maior cobertura vacinal. Até o dia 06 de dezembro o DF registrou cobertura, considerando população maior de 18 anos, de D1 de 88,3% e de D2 de 77,3%. E em jovens de 12 a 17, cobertura de D1 de 80,2%. Estudos mostram o impacto da vacinação na redução de incidência de hospitalizações e mortes, especialmente em indivíduos vulneráveis com comorbidades e outros fatores de risco (MOGHADAS et al., 2021)(YI et al., 2022).

Desde o início da pandemia de covid-19 a emergência de novas variantes tem sido uma grande preocupação de saúde pública. A variação genômica típica de vírus de RNA resulta em mutações, que por sua vez, podem ter consequências como aumento de transmissibilidade, patogenicidade, e escape imunológico (CAMP et al., 2021). No caso do SARS-CoV-2, logo na fase inicial da pandemia em 2020, ficou evidente que a evolução viral seria um desafio. Em fevereiro de 2020, a mutação D614G, foi detectada na Europa, e variantes contendo essa mutação rapidamente se

tornaram dominantes (GROVES; ROWLAND-JONES; ANGYAL, 2021). Nesse contexto, a vigilância genômica é essencial para a rápida identificação de novas mutações e para auxiliar na tomada de decisões frente a uma mudança no cenário epidemiológico (CAMP et al., 2021).

Buscando celeridade e menor custo, muitos laboratórios de diagnóstico, como o nosso, passaram a utilizar a RT-qPCR para detectar mutações específicas e determinar a variante presumida ao invés de realizar sequenciamento parcial ou completo do genoma (CAMP et al., 2021). A genotipagem realizada neste estudo permitiu a detecção prospectiva e oportuna de 3 picos principais, sendo cada um deles causado pela circulação de uma nova variante de SARS-CoV-2 na Cidade Estrutural.

A variante Alpha foi detectada pela primeira vez em setembro de 2020 e foi a primeira variante de preocupação declarada pela OMS (CHAVDA; PATEL; VAGHASIYA, 2022). No DF, não existem muitos dados disponíveis acerca da circulação dessa variante, os primeiros casos foram registrados no final de dezembro de 2020, quando já havia circulação da Gama. Na Cidade Estrutural, foi detectado apenas um caso dessa variante, na SE 12. Esse resultado pode ser atribuído ao tempo de início do estudo, quando já havia predominância da variante Gama.

O primeiro pico foi provocado pela variante P.1, posteriormente denominada Gama. Alguns estudos sugerem que o surgimento dessa variante tenha ocorrido em novembro de 2020, em Manaus (AM) (GIOVANETTI et al., 2022)(NAVECA et al., 2021). Em São Paulo, a variante Gama rapidamente se tornou predominante, passando de uma representação de 20% das amostras sequenciadas no mês de janeiro, para 90% em abril de 2021 (CAMARGO et al., 2021). No Distrito Federal (DF), o padrão foi o mesmo, foi possível detectar a variante Gama já nas primeiras semanas de janeiro e a partir da SE 11 de 2021 100% das amostras sequenciadas correspondiam a Gama. Na Cidade Estrutural foi possível observar a circulação dessa variante até o final do mês de julho, quando o cenário passou a ser dominado pela variante Delta.

Em 24 de março de 2021, a variante Delta (B.1.617) surgiu na Índia durante a segunda onda com um conjunto característico de mutações (T478K,

P681R e L452R) que foram responsáveis pelo aumento da infectividade e imunidade a neutralização por anticorpos (DHAWAN et al., 2022). Em poucos meses, a variante Delta passou a ser detectada em diversos países, e rapidamente tornou-se predominante (CHOI JY, 2021). No Brasil, os primeiros casos foram registrados na primeira semana de julho de 2021, e o primeiro caso detectado na Estrutural foi no dia 02 de agosto de 2021. Em três semanas, a variante Delta se sobrepôs completamente a Gama, sendo detectada em 100% das amostras genotipadas na SE 38.

A variante Ômicron foi inicialmente detectada na África do Sul e reportada à OMS em 24 de novembro de 2021. Também conhecida como B.1.1.529, ela rapidamente se espalhou e se tornou uma variante de preocupação. Análises realizadas posteriormente sugeriram que o seu surgimento esteve associado à circulação entre pacientes cronicamente infectados, à baixa taxa de imunização na África ou ainda à evolução de SARS-CoV-2 em outros animais (FAN et al., 2022).

Na Cidade Estrutural, o primeiro caso de Ômicron foi detectado na SE 50 de 2021, no dia 29 de dezembro de 2021. Rapidamente, essa nova variante sobrepujou a Delta, se tornando a única variante detectada até a última semana analisada. No Brasil, no dia 27 de dezembro de 2021 a variante Ômicron correspondia a 34% das amostras sequenciadas, esse número passou para 93% em 10 de janeiro de 2022 (XAVIER et al., 2022). Comportamento semelhante ao encontrado neste estudo. A maior taxa de transmissibilidade da Ômicron em relação à Delta explica essa rápida substituição das variantes em áreas de transmissão comunitária, e pode ser atribuída principalmente à capacidade de evasão imunológica, alterações na entrada e no tropismo celular apresentadas pela variante Ômicron (FAN et al., 2022). Devido à alta taxa de mutação dessa variante, várias preocupações surgiram, principalmente em relação ao efeito dessas mutações na resposta às vacinas, na modulação da imunidade do hospedeiro e nas taxas de transmissão e infectividade (KANDEEL et al., 2022). Inicialmente, haviam sido relatadas duas subvariantes principais, BA.1 e BA.2 (HACHMANN et al., 2022). Através da análise do sequenciamento foi possível observar a

circulação de duas linhagens, BA.1 e BA.1.1. A variante BA.1 foi a linhagem mais prevalente inicialmente, e gradualmente foi sendo substituída pela BA.2 (FAN et al., 2022).

A utilização do sequenciamento do gene S em parte das amostras genotipadas por RT-qPCR resultou em concordância de 100%, mostrando que ambas as técnicas podem auxiliar no rastreamento de novas variantes de SARS-CoV-2 com um custo e complexidade menores. A combinação de vigilância genômica usando essas duas metodologias foi aplicada em outro estudo e foi capaz de fornecer informações acerca da diversidade de sub-linhagens da Ômicron e um retrato da situação epidemiológica local (REIS et al., 2024).

7. Conclusão

Sistemas de vigilância locais podem ajudar a monitorar mudanças sazonais na circulação de vírus respiratório. Nesse sentido, a pandemia de SARS-CoV-2 destacou a importância da vigilância voltada para a comunidade e demonstrou a importância dos testes moleculares e dos ensaios de sequenciamento genômico como estratégias para a caracterização molecular e vigilância epidemiológica de infecções respiratórias virais.

Neste estudo, ensaios de metagenômica realizados com amostras nasofaríngeas levaram a uma melhor caracterização do perfil de circulação de vírus ao longo da pandemia e permitiram a detecção de infecções por outros vírus respiratórios em pacientes atendidos com SG e com testagem negativa para SARS-CoV-2, além de comprovarem a ausência da circulação sazonal típica de FluA na temporada de 2021. Além disso, infecções não esperadas por arbovírus CHIKV também foram detectadas por meio de metagenômica em pacientes atendidos com SG, comprovando a utilidade do ensaio para a detecção de agentes etiológicos em amostras biológicas consideradas alternativas.

Como alternativa ao sequenciamento genômico, ensaios de RT-qPCR se mostraram viáveis para a detecção rápida e oportuna de variantes de SARS-CoV-2 (Alfa, Gama, Delta e Ômicron).

Utilizando-se diferentes abordagens moleculares, foi possível realizar a vigilância da circulação de vírus respiratórios em uma população vulnerável, residente na Cidade Estrutural, durante o período de um ano.

8. Referências

ACHANGWA, C. et al. Collateral Impact of Public Health and Social Measures on Respiratory Virus Activity during the COVID-19 Pandemic 2020–2021. **Viruses**, v. 14, n. 5, 2022.

ALEEM, A.; AKBAR SAMAD, A. B.; SLENKER, A. K. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). **StatPearls**, p. 1–24, 2021.

ALONSO, W. J.; TAMERIUS, J.; FREITAS, A. R. R. Respiratory syncytial virus causes more hospitalizations and deaths in equatorial Brazil than influenza (including during the 2009 pandemic). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, n. 1, p. 1–11, 2020.

AMIT KUMAR MANDAL , PAULAMI DAM , OCTAVIO L. FRANCO , HANEN SELLAMI , SUKHENDU MANDAL , GULTEN CAN SEZGIN , KINKAR BISWAS , PARTHA SARATHI NANDI, I. O. COVID-19 pandemic disturbs respiratory virus dynamics. **Lancet Respir Med.**, v. 10, n. August, 2022.

BINNS, E. et al. Influenza and respiratory syncytial virus during the COVID-19 pandemic: Time for a new paradigm? **Pediatric Pulmonology**, v. 57, n. 1, p. 38–42, 2022.

BRANCHE, A. R.; FALSEY, A. R. Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults: An Under-Recognized Problem. **Drugs and Aging**, v. 32, n. 4, p. 261–269, 2015.

CAMARGO, C. H. et al. Um ano de pandemia da COVID-19: diversidade genética do SARS-CoV-2 no Brasil A year of the COVID-19 pandemic: genetic diversity of SARS-COV-2 in Brazil. **Bepa**, v. 18, n. 207, p. 12–33, 2021.

CAMP, J. V. et al. RT-PCR based SARS-CoV-2 variant screening assays require careful quality control. **Journal of Clinical Virology**, v. 141, n. August, 2021.

CHAVDA, V. P.; PATEL, A. B.; VAGHASIYA, D. D. SARS-CoV-2 variants and vulnerability at the global level. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 7, p. 2986–3005, 2022.

- CHEN, Z. et al. surveillance and data sharing. 2021.
- CHI, X. et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 650–655, 2020.
- CHIU, C. Y.; MILLER, S. A. Clinical metagenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 341–355, 2019.
- CHOI JY, S. D. SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 11, p. 961–968, 2021.
- CHOTPITAYASUNONDH, T. et al. Influenza and COVID-19: What does co-existence mean? **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 15, n. 3, p. 407–412, 2021.
- CODEPLAN. **Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios - PDAD - 2021**. Disponível em: <<https://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2022/05/SCIA.pdf>>.
- CRUVINEL, V. R. N. et al. Health conditions and occupational risks in a novel group: Waste pickers in the largest open garbage dump in Latin America. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2019.
- CRUVINEL, V. R. N. et al. Vector-borne diseases in waste pickers in Brasília, Brazil. **Waste Management**, v. 105, p. 223–232, 2020.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.
- DE OLIVEIRA, E. C. et al. Short report: Introduction of chikungunya virus ecsa genotype into the brazilian midwest and its dispersion through the americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 1–10, 2021.
- DENG, X. et al. Metagenomic sequencing with spiked primer enrichment for viral diagnostics and genomic surveillance. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 443–454, 2020.
- DF, S. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento da Síndrome Gripal e Síndrome Respiratória Aguda Grave no Distrito Federal até a Semana Epidemiológica 52 de 2022**. Disponível em: <<https://www.saude.df.gov.br/gripe-1>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- DF, S. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento da Síndrome Gripal**

e Síndrome Respiratória Aguda Grave no Distrito Federal até a Semana Epidemiológica 52 de 2023. Disponível em:

<<https://www.saude.df.gov.br/gripe-1>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

DHARMAPALAN, D. Influenza. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 10, p. 828–832, 2020.

DHAWAN, M. et al. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 18, n. 5, p. 1–12, 2022.

DUBEY, A. et al. Emerging SARS-CoV-2 Variants: Genetic Variability and Clinical Implications. **Current Microbiology**, v. 79, n. 1, 2021.

DURMAZ, B.; ABDULMAJED, O.; DURMAZ, R. Mutations observed in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein and their effects in the interaction of virus with ACE-2 receptor. **Medeniyet Medical Journal**, v. 35, n. 3, p. 253–260, 2020.

FAICO-FILHO, K. S.; BARBOSA, G. R.; BELLEI, N. Peculiar H3N2 outbreak in São Paulo during summer and emergence of the Omicron variant. **Journal of Infection**, v. 85, n. 1, p. 90–122, 2022.

FAN, Y. et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

FITZNER, J. et al. Revision of clinical case definitions: Influenza-like illness and severe acute respiratory infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 2, p. 122–128, 2018.

GALVAN, D. et al. Can socioeconomic, health, and safety data explain the spread of COVID-19 outbreak on brazilian federative units? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 23, p. 1–16, 2020.

GERDOL, M.; DISHNICA, K.; GIORGETTI, A. Emergence of a recurrent insertion in the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Virus Research**, v. 310, n. January, 2022.

GIOVANETTI, M. et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1490–1500, 2022.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory

syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

GRANDE AJ, KEOGH J, SILVA V, S. A. Exercise versus no exercise for the occurrence, severity, and duration of acute respiratory infections. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2020.

GRIEF, S. N.; MILLER, J. P. Infectious Disease Issues in Underserved Populations. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 1, p. 67–85, 2017.

GROVES, D. C.; ROWLAND-JONES, S. L.; ANGYAL, A. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, n. January, p. 104–107, 2021.

GURUPRASAD, L. Human SARS CoV-2 spike protein mutations. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 89, n. 5, p. 569–576, 2021.

HACHMANN NP, MILLER J, COLLIER AY, VENTURA JD, YU J, ROWE M, BONDZIE EA, POWERS O, SURVE N, HALL K, B. D. Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. **N Engl J Med.**, v. 7, n. Jul, p. 387, 2022.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, n. December, 2020.

HUI, D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 91, p. 264–266, 2020.

IBRAHIM, N. Epidemiologic surveillance for controlling Covid-19 pandemic: types, challenges and implications. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. January, p. 1630–1638, 2020.

JAVANIAN, M. et al. A brief review of influenza virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 8, p. 4638–4646, 2021.

JEFFERSON T, ET AL. Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses (Review). **Cochrane Database of**

Systematic Reviews, n. 11, 2020.

JESTER, B.; UYEKI, T.; JERNIGAN, D. Readiness for Responding to a Severe Pandemic 100 Years After 1918. **American journal of epidemiology**, v. 187, n. 12, p. 2596–2602, 2018.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. July 2015, p. S471–S474, 2016.

KANDEEL, M. et al. Omicron variant genome evolution and phylogenetics. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 4, p. 1627–1632, 2022.

KO, K. K. K.; CHNG, K. R.; NAGARAJAN, N. Metagenomics-enabled microbial surveillance. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 486–496, 2022.

KRAMMER, F. et al. Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–21, 2018.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.

LEMA, N. K.; GEMEDA, M. T.; WOLDESEMAYAT, A. A. Recent Advances in Metagenomic Approaches, Applications, and Challenge. **Current Microbiology**, v. 80, n. 11, 2023.

LIPPI, G.; MATTIUZZI, C.; HENRY, B. M. Updated picture of SARS-CoV-2 variants and mutations. **Diagnosis**, v. 9, n. 1, p. 11–17, 2022.

LJUBIN-STERNAK, S. et al. Seasonal Coronaviruses and Other Neglected Respiratory Viruses: A Global Perspective and a Local Snapshot. **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. July, p. 1–10, 2021.

LUO, M. et al. The priority for prevention and control of infectious diseases: Reform of the Centers for Disease Prevention and Control – Occasioned by “the WHO chief declares end to COVID-19 as a global health emergency”. **BioScience Trends**, v. 17, n. 3, p. 239–244, 2023.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MEJIAS A, RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ R, OLIVA S, PEEPLES ME, R. O. The Journey to an RSV Vaccine. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 125, n. 1, p. 36–46, 2020.

MILLER, R. R. et al. Metagenomics for pathogen detection in public health. **Genome Medicine**, v. 5, n. 9, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de tratamento de Influenza**. [s.l.: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe SE 52 | Vigilância das Síndromes Gripais Influenza, covid-19 e outros vírus respiratórios de importância em saúde pública**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/coronavirus/atualizacao-de-casos/informe_svsa_sindromes_gripais-se-52/view>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MOGHADAS, S. M. et al. The Impact of Vaccination on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreaks in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 12, p. 2257–2264, 2021.

MOHAMADIAN, M. et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1–11, 2020.

MORIYAMA, MIYU; HUGENTOBLE, WALTER J; IWASAKI, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. **Annual Review of Virology**, v. 7, n. 1, p. 012420–022445, 2020.

MOSSCROP, L. G.; WILLIAMS, T. C.; TREGONING, J. S. Respiratory syncytial virus after the SARS-CoV-2 pandemic — what next? **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 10, p. 589–590, 2022.

MUSSO, D. et al. Detection of chikungunya virus in saliva and urine. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–4, 2016.

NAM, H. H.; ISON, M. G. Respiratory syncytial virus infection in adults. **The BMJ**, v. 366, 2019.

NASTRI, A. C. et al. Understanding Sabi a. v. 48, n. March, 2022.

NAVECA, F. G. et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1238, 2021.

NIEDRIG, M. et al. Find the right sample: A study on the versatility of

saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2018.

OBANDO-PACHECO, P. et al. Respiratory syncytial virus seasonality: A global overview. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1356–1364, 2018.

OLIVEIRA, T. C.; ABRANCHES, M. V.; LANA, R. M. Food (in)security in Brazil in the context of the SARS-CoV-2 pandemic. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 4, 2020.

ORGANIZATION, W. H. Global Surveillance for COVID-19 disease caused by human infection with novel coronavirus (COVID-19). **[https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov))**, n. January, p. 2019–2020, 2020.

PERK, Y.; ÖZDİL, M. Respiratory syncytial virüs infections in neonates and infants. **Turk Pediatri Arsivi**, v. 53, n. 2, p. 63–70, 2018.

PRIETO, J. T. et al. Will participatory syndromic surveillance work in Latin america? piloting a mobile approach to crowdsource influenza-like illness data in Guatemala. **JMIR Public Health and Surveillance**, v. 3, n. 4, 2017.

REGUA-MANGIA. Métodos Moleculares na Vigilância Epidemiológica de Doenças. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, p. 1–12, 2015.

REIS, A. C. et al. Systematic SARS-CoV-2 S-gene sequencing in wastewater samples enables early lineage detection and uncovers rare mutations in Portugal. **Science of the Total Environment**, v. 921, n. October 2023, 2024.

RICARDO, A.; FREITAS, R.; DONALISIO, M. R. Respiratory syncytial virus seasonality in Brazil : implications for the immunisation policy for at-risk populations. v. 111, n. May, p. 294–301, 2016.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, T. M.; HOLLISTER, E. B. Potential Applications of Human Viral Metagenomics and Reference Materials: Considerations for Current and Future Viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 22, p. 1–12, 2020.

SANTOS, S. G., F. et al. Syphilis and other sexually transmitted infections among waste pickers in Brasilia, Brazil. **Waste Management**, v. 118, p. 122–130, 2020.

SANTOS, C. A. DOS et al. SARS-CoV-2/influenza A (H3N2) virus coinfection: epidemiological surveillance in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, n. June, p. e0132, 2022.

SUN, K.; CHEN, J.; VIBOUD, C. Early epidemiological analysis of the coronavirus disease 2019 outbreak based on crowdsourced data: a population-level observational study. **The Lancet Digital Health**, v. 2, n. 4, p. e201–e208, 2020.

TAZERJI, S. S. et al. An Overview of Anthropogenic Actions as Drivers for Emerging and Re-Emerging Zoonotic Diseases. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1–26, 2022.

TRAVERSE, E. M. et al. Chikungunya Immunopathology as It Presents in Different Organ Systems. **Viruses**, v. 14, n. 8, 2022.

VIEZZER, J.; BIONDI, D. The influence of urban, socio-economic, and eco-environmental aspects on COVID-19 cases, deaths and mortality: A multi-city case in the Atlantic Forest, Brazil. **Sustainable Cities and Society**, v. 69, n. March, p. 102859, 2021.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tracking SARS-CoV-2 variants**.

XAVIER, C. R. et al. Characterisation of Omicron Variant during COVID-19 Pandemic and the Impact of Vaccination, Transmission Rate, Mortality, and Reinfection in South Africa, Germany, and Brazil. **BioTech**, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2022.

YADAV, R. et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2021.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685–700, 2021.

YEOH DK, FOLEY DA, MINNEY-SMITH CA, MARTIN AC, MACE AO, SIKAZWE CT, LE H, LEVY A, BLYTH CC, M. H. The impact of COVID-19 public health measures on detections of influenza and respiratory syncytial virus in children during the 2020 Australian winter Daniel. **Clin Infect Dis**, v. 72, n. 12, p. 2199–2202, 2020.

YI, S. et al. Impact of national Covid-19 vaccination Campaign, South Korea. **Vaccine**, v. 40, n. 26, p. 3670–3675, 2022.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinf

Letter to the Editor

Viral metagenomics in nasopharyngeal swabs of Brazilian patients negative for SARS-CoV-2 unveils the presence of Chikungunya virus infection


Dear editor,

We read with great interest the manuscript published by Le et al. reporting the detection of Rhinovirus and SARS-CoV-2 co-infection by viral metagenomics [1]. The application of metagenomics is useful for the management of COVID-19 patients and gives essential information for the presence of co-infections which additionally can worsen the clinical prognosis. The authors of the above-cited study tested exclusively patients with a SARS-CoV-2 confirmed infection. A syndromic surveillance data obtained in Brasília, Brazil showed that only 33% of patients were SARS-CoV-2 positive. We therefore applied viral metagenomics on SARS-CoV-2 negative samples in order to characterize the co-circulating respiratory viruses in the Federal District of Brazil. Currently, pan-pathogen assays based on viral metagenomics uncover a variety of fungus, bacterial and viral co-infections in COVID-19 patients [2,3] which justifies the application of metagenomics in order to detect other circulating respiratory viruses. Moreover, there is no information on which respiratory viruses most commonly co-circulate in the examined Brazilian region.

In this study, samples were obtained from residents of the Cidade Estrutural, Federal District of Brazil, who sought primary healthcare for suspicion of COVID-19. The ecological and demographic characteristics of the examined region (Fig. 1A) favor the emergence and re-emergence of viral infections including respiratory, food- and arthropod-borne. Patients with COVID-19-like symptoms for 3 to 10 days who sought medical assistance at a primary health center at the Cidade Estrutural, between March and May 2020 were included. All of them signed a written informed consent approved by the Ethics Commission of the Faculty of Medicine, University of Brasília (CEP-FM/UnB, CAAE 39,892,420.7.1001.5558; CAAE 40,557,020.6.3001.5553) and Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS/SES/DF, CAAE 40,557,020.6.3001.5553). Nasopharyngeal swabs (NS) were routinely collected for SARS-CoV-2 molecular diagnosis. The viral metagenomics was performed on 160 patients (58 males and 102 females; average age of 33±12.34 years of age) who presented negative SARS-CoV-2 RT-PCR results. The NS were initially centrifuged at low speed for cell depletion and pretreated with 20 U DNase per sample (Ambion). Eight samples were then pooled and subjected to RNA extraction, reverse transcription and amplification as previously described [4]. Genomic libraries were prepared using Illumina DNA prep kit (Illumina) with the IDT for Illumina DNA/RNA UD indexes following the manufacturer's instructions. The sequencing was performed in Illumina NovaSeq 6000 platform using the NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (300 cycles) (Illumina). The virome abundance was accessed using a previously established

bioinformatic pipeline [4]. In brief, the pipeline was composed of FastQC v.0.11.08, Trimmomatic v.0.3.9, Cutadapt v. 2.4, AfterQC v. 0.9.7, Kraken2 v.2.0.8, Spades 3.13.0, and Diamond 0.9.29 software. The sequence alignment and editing of the important contigs was performed using MAFFT v7.453 and Aliview programs. The maximum likelihood tree was reconstructed using IQ-TREE v1.6.12 with a statistical support of 1000 bootstrap replicates.

The metagenomic analysis of 160 NS samples assembled into 20 pools revealed Chikungunya virus (CHIKV) genomic reads into two pools (namely, 11 and 18). These two pools generated a total abundance of 10,654,714 reads from which just 3357 were classified as viral (0.03%), which was normal as viruses did not make part of the normal microbial composition of the nasopharynx. We classified as CHIKV 46 reads in pool 11 and 92 reads in pool 18. The identification of CHIKV reads in NS puzzled us and therefore we proceeded to test samples from the CHIKV-positive pools using Reverse Transcription PCR (RT-PCR). RT-PCR assays were carried out with two previously described sets of primers detecting both circulating in Brazil CHIKV genotypes [5] in Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System. Two samples of the NS showed RT-PCR positive results for CHIKV, one sample from each CHIKV-positive pool. The amplification threshold (Ct) of both samples demonstrated well-presented viral load (Cts were 28 and 26 respectively) (Fig. 1B). The positive samples belonged to patients with suspicion of SARS-CoV-2 infection. One of them was a female, 33 years old patient who reported fever, headache, jaundice, myalgia and earache. The other patient was male individual with 41 years of age, who reported fever, myalgia, retro-orbital pain, cough, headache, algesia, jaundice, anosmia, hyporexia and consciousness changes.

Here, the potential of metagenomics to detect unsuspected viral agents in any type of clinical sample has been demonstrated, while it was also revealed that arthropod-borne viruses (arboviruses) were largely neglected during the SARS-CoV-2 pandemic. While the NS is a common procedure to diagnose influenza, SARS, MERS-CoV, COVID-19 and other respiratory infections, the sampling of blood is the procedure of choice for arboviral diagnosis [6]. Although saliva has also been a suitable clinical sample for CHIKV RNA detection during the first week after symptoms onset [7,8], to our knowledge this is the first report showing the metagenomic evaluation and confirmation of CHIKV RNA in NS samples. The detection of CHIKV RNA was only possible due to the application of metagenomics, since CHIKV infection was not suspected as a causative agent of the reported symptoms. The presence of multiple viruses co-circulating in a symptomatic population may hide the presence of less-expected viral agents, mainly during the COVID-19 pandemic, which was our case. Therefore, viral metagenomics is a powerful diagnostic tool not only for analysis of the viral diversity in clinical samples but also provides important information regarding epidemiological surveillance and circulating

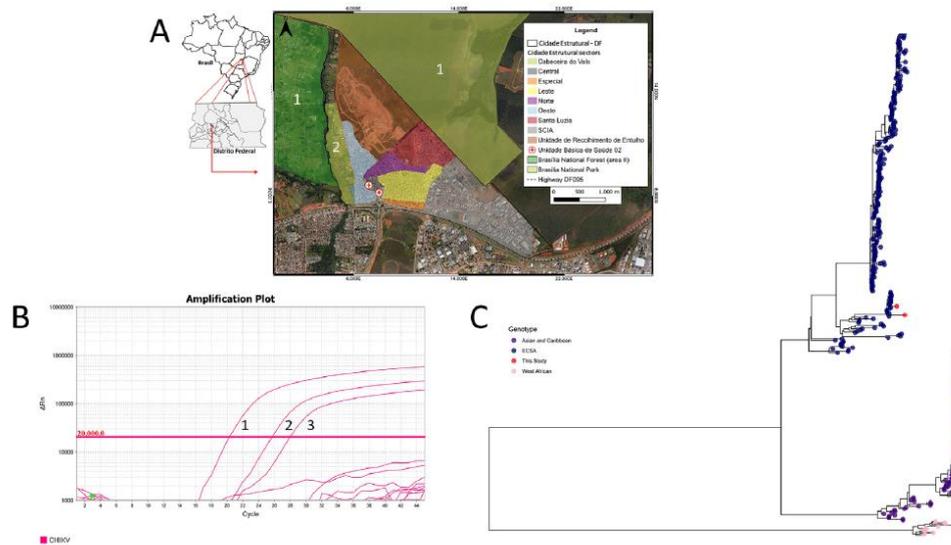


Fig. 1. Estrutural City location map, CHIKV confirmatory RT-qPCR assay and maximum likelihood tree. A) The Cidade Estrutural has 40,000 inhabitants of whom 4000 are waste pickers and has the lowest HDI of the Federal District of Brazil. The city borders the Brasília National Forest, which is an environmental protection area of 423.6 km² characterized by the typical wooded savanna (Cerrado) (landmark 1), and Cabeceira do Valo, where residents often farm vegetables (landmark 2); B) Representative amplification plot of confirmatory RT-qPCR assay showing the CHIKV positive control (observe 1), positive sample from pool 18 (observe 2) and positive sample from pool 11 (3). C) Approximate maximum likelihood tree of the obtained Chikungunya virus (CHIKV) contigs during the metagenomic analysis of nasopharyngeal swabs (2 contigs of 655 and 718 bp belonging to the nonstructural polyprotein). In the phylogenetic reconstruction 397 complete CHIKV genomes obtained from the GenBank were used under the GTR+G4+F nucleotide substitution model with a statistical support of 1000 bootstrap replicates. The phylogenetic tree showed 3 major clades comprising the CHIKV genotypes. Our samples (red dots) were clustered along the CHIKV East-Central-South African genotype, which by far is the most common genotype in Brazil.

viruses [9]. In support of this, we performed phylogenetic analysis of the obtained viral contigs, which identified the circulation of ECSA CHIKV genotype, the most widely spread CHIKV genotype in Brazil (Fig. 1C).

In summary, our study demonstrates the use of viral metagenomics for identification of unsuspected viral agents in NS of patients showing respiratory symptoms, but negative for SARS-CoV-2 RNA. This investigation draws the attention to the circulation of viruses, which are clinically important but have been largely neglected/unsuspected during the SARS-CoV-2 pandemic but must be included in the differential diagnosis of the patients. Despite the significant advantages of the metagenomics for virus identification, some issues like cost-efficiency, need of high-cost equipment and laboratory expertise must be carefully analyzed in regards to metagenomic application for diagnostic purposes especially in resource-limited countries.

Funding

This project was supported financially by Brazilian Ministry of Education (MEC) (grant number: 23,106.028855/2020–74) and Federal District Research Foundation (FAP-DF) (grant number: 00193–00000495/2020–72)

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Van Tan L, Thi Thu Hong N, My Ngoc N, Tan Thanh T, Thanh Lam V, Anh Nguyet L, et al. SARS-CoV-2 and co-infections detection in nasopharyngeal throat swabs of COVID-19 patients by metagenomics. *J Infect* 2020;**81**:e175–7. doi:10.1016/j.jinf.2020.06.033.

2. Peddu V, Shean RC, Xie H, Shrestha L, Perchetti GA, Minot SS, et al. Metagenomic Analysis Reveals Clinical SARS-CoV-2 Infection and Bacterial or Viral Superinfection and Colonization. *Clin Chem* 2020;**66**:966–72. doi:10.1093/clinchem/hvaa106.
3. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2020;**81**:266–75. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.046.
4. Dos Santos Bezerra R, de Melo Jorge DM, ÍA Castro, Moretto EL, Scalón de Oliveira L, Ubiali EMA, et al. Detection of Influenza A(H3N2) Virus RNA in Donated Blood. *Emerg Infect Dis* 2020;**26**:1621–3. doi:10.3201/eid2607.200549.
5. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India. *Emerg Infect Dis* 2006;**13**:764–7. doi:10.3201/eid1305.070015.
6. Niedrig M, Patel P, El Wahed AA, Schädler R, Yactayo S. Find the right sample: a study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. *BMC Infect Dis* 2018;**18**:707. doi:10.1186/s12879-018-3611-x.
7. Musso D, Teissier A, Rouault E, Teururai S, de Pina JJ, Nhan TX. Detection of chikungunya virus in saliva and urine. *Virology* 2016;**13**:102. Erratum in: *Virology* 2016;**13**(1):120. doi:10.1186/s12985-016-0556-9.
8. Gardner J, Rudd PA, Prow NA, Belarbi E, Roques P, Larcher T, et al. Infectious Chikungunya Virus in the Saliva of Mice, Monkeys and Humans. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0139481. doi:10.1371/journal.pone.0139481.
9. d’Humières C, Salmona M, Dellière S, Leo S, Rodriguez C, Angebault C, et al. The Potential Role of Clinical Metagenomics in Infectious Diseases: therapeutic Perspectives. *Drugs* 2021;**81**:1453–66. doi:10.1007/s40265-021-01572-4.

Tatyane de Souza Cardoso Quintão
Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District,
Brazil

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

Svetoslav Nanev Slavov
Butantan Institute, São Paulo, Brazil
Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Pâmela Maria de Oliveira
Molecular Diagnostics Laboratory, University Hospital of
Brasília/EBSEERH, Federal District, Brazil

Rafael dos Santos Bezerra
Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Évelin Mota Cassemiro
Molecular Diagnostics Laboratory, University Hospital of
Brasília/EBSERH, Federal District, Brazil

Priscilla Pedrette de Melo Alves
Laboratory of Geography, Environment and Health, University of
Brasília, Federal District, Brazil

Carolina Carvalho Gontijo
Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District,
Brazil

Human Genetics Laboratory, Institute of Biological Sciences,
University of Brasília, Federal District, Brazil

Fabiano dos Anjos Pereira Martins
Communicable Diseases Surveillance Department, Secretariat of
Health of the Federal District, Federal District, Brazil

Helen da Costa Gurgel
Laboratory of Geography, Environment and Health, University of
Brasília, Federal District, Brazil

Elza Ferreira Noronha
Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District,
Brazil

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

Walter Massa Ramalho, Wildo Navegantes de Araújo
Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District,
Brazil

Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Federal District, Brazil

Alex Leite Pereira
Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Federal District, Brazil

Rodrigo Haddad*
Center for Tropical Medicine, University of Brasília, Federal District,
Brazil

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

*Corresponding author.
E-mail address: haddad@unb.br (R. Haddad)