
A implementação desta técnica obteve o 1º lugar da categoria Ação do 5º Prêmio Inovação Medical Services – Novos Caminhos em Saúde Pública - SANOFI, em abril de 2013.

A importância da implementação de técnica de metagenômica viral em laboratórios de saúde pública

Silvana Beres CASTRIGNANO¹, Teresa Keico NAGASSE-SUGAHARA¹, Jonas José KISIELIUS², Marli UEDA-ITO², Suely Pires CURTI¹

¹Núcleo de Doenças Respiratórias – Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz

²Núcleo de Microscopia Eletrônica – Centro de Procedimentos Interdisciplinares – Instituto Adolfo Lutz

Metagenômica viral pode ser definida como a análise genômica da comunidade viral presente em uma amostra de material biológico ou ambiental através da utilização de técnicas moleculares, independentemente de: (1) cultura de células; (2) testes que utilizam painéis de soro que, através de reações cruzadas, possam indicar a natureza do vírus da amostra; (3) uso de *primers* ou sondas de hibridização específicos ou degenerados^{1,2}.

As técnicas de metagenômica viral têm em comum a purificação do vírus a partir da amostra, amplificação sequência-independente de segmentos de ácidos nucleicos, produção de bibliotecas genômicas e sequenciamento. As bibliotecas genômicas podem ter suas sequências segregadas em vetores (por exemplo, plasmídeos) ou em superfícies sólidas (planas ou esféricas)³. A construção de bibliotecas em vetores necessita de clonagem em células bacterianas e posteriormente extração do vetor para sequenciamento. Diferentes técnicas podem anteceder a geração destas bibliotecas: a amplificação independente da sequência com *primer* único (*Sequence-Independent, Single-Primer Amplification* – SISPA); a análise de diferença

representacional (*Representational Difference Analysis* – RDA); a descoberta de vírus pela amplificação de fragmentos polimórficos quanto ao tamanho de cDNA (*Virus Discovery cDNA-Amplified fragment length polymorphism* – VIDISCA); a apresentação diferenciada (*Differential Display* – DD)¹. As técnicas em que as sequências da biblioteca estão ligadas a superfície sólida, chamadas de nova geração, geram enormes volumes de sequências em pouco tempo, mas exigem um investimento financeiro maior do que o das anteriores. A partir de 2005, foram colocadas no mercado as plataformas de sequenciamento de nova geração, como 454 FLX (Roche), Genome Analyzer (Illumina), SOLiD (Applied Biosystems) e Ion Torrent PGM (Life Technologies)³. Independentemente da técnica de metagenômica utilizada, a etapa de análise e investigação dos fragmentos sequenciados e de sua organização em segmentos contíguos necessita de ferramentas de bioinformática e, muitas vezes, de retorno à bancada do laboratório para testes. Esta etapa é demorada, principalmente quando se está diante de um novo genoma que não tem pareamento ou se alinha com baixa identidade a sequências depositadas em base pública de dados como o GenBank.

Com o advento da metagenômica viral, cresceu exponencialmente o número de descobertas de novos vírus e a caracterização genômica de vírus previamente conhecidos em animais, plantas, seres humanos e no ambiente. No caso dos seres humanos, citamos alguns exemplos importantes: rotavírus, astrovírus, herpesvírus humano tipo 8, vírus GB humano, Torque Teno Vírus (TTV), coronavírus HCoV-NL63, bocavírus, parvovírus 4, poliomavírus WU e KI, rabdovírus associado a febre hemorrágica na África Central, bunyavírus associado a síndrome que cursa com febre, trombocitopenia e leucopenia na China, vírus circo-*like* em fezes humanas^{1,3,4,5,6}.

O Instituto Adolfo Lutz recebe amostras biológicas de todo o Estado de São Paulo para realizar a pesquisa do agente etiológico de uma doença de um paciente ou de um grupo de pacientes. Algumas vezes, apesar do forte indício clínico de a doença ter sido causada por vírus e/ou de terem sido detectadas, através de microscopia eletrônica, partículas virais na amostra clínica ou em uma cultura de células inoculada com material biológico, não se obtêm resultados que indiquem o vírus causador, mesmo quando todos os ensaios específicos disponíveis para detectar os agentes suspeitos foram utilizados. A ideia de implantarmos a técnica de metagenômica teve o intuito de ajudar a solucionar a etiologia desses casos clínicos, pois se pode estar diante de um vírus ainda desconhecido ou pode-se detectar um vírus conhecido causando um quadro clínico ainda não associado a ele na literatura.

A literatura mundial também relata um desconhecimento da causa etiológica em uma grande porcentagem dos casos de síndromes clínicas comuns, mesmo em estudos que pesquisam uma ampla variedade de patógenos específicos: cerca de 30 a 50% dos casos de encefalites, gastroenterites agudas e doenças respiratórias agudas de provável etiologia infecciosa permanecem sem causa definida, com vários desses casos podendo ser de origem viral^{7,8,9,10,11,12}.

Diante dessas razões, implementamos no Instituto Adolfo Lutz uma técnica de metagenômica SISPA. Durante a implementação desta técnica, analisamos uma amostra de fezes humanas diarreicas e nela foi possível a identificação de dois novos vírus de genoma circular DNA, com 92% de identidade entre eles. Estes vírus provavelmente pertencem a uma nova subfamília da família *Circoviridae* ou a uma nova família de vírus circo-*like* com genoma DNA circular que codifica uma proteína associada à replicação (Rep)¹³.

Pode-se concluir que uma técnica de metagenômica viral foi implementada no Instituto Adolfo Lutz e já possibilitou a descoberta de dois novos vírus em uma amostra fecal humana. A técnica de metagenômica viral em laboratório de saúde pública é uma ferramenta importante na pesquisa de novos vírus em seres humanos e que pode ajudar a esclarecer o agente causador de diferentes quadros clínicos.

REFERÊNCIAS

1. Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol.* 2006; 16: 365-83.
2. Delwart EL. Viral metagenomics. *Rev Med Virol.* 2007;17:115-31.
3. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci.* 2011;12:7861-84.
4. Grard G, Fair, JN, Lee D, Slikas E, Steffen I, Muyembe JJ, et al. A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002924.
5. Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, et al. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol.* 2009;83:4642-51.
6. Xu B, Liu L, Huang X, Ma H, Zhang Y, Du Y, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002369.
7. Bloch KC, Glaser C. Diagnostic approaches for patients with suspected encephalitis. *Curr Infect Dis Rep.* 2007;9:315-22.
8. Chiu CY, Urisman A, Greenhow TL, Rouskin S, Yagi S, Schnurr D, et al. Utility of DNA microarrays for detection

-
- of viruses in acute respiratory tract infections in children. *J Pediatr*. 2008;153:76-83.
9. Denno DM, Stapp JR, Boster DR, Qin X, Clausen CR, Del Beccaro KH, et al. Etiology of diarrhea in pediatric outpatient settings. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:142-48.
10. Denno DM, Shaikh N, Stapp JR, Qin X, Hutter CM, Hoffman V, et al. Diarrhea etiology in a pediatric emergency department: a case control study. *Clin Infect Dis*. 2012;55:897-904.
11. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2006;43:1567-77.
12. Mailles A, Stahl JP, Steering Committee and Investigators Group. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1838-47.
13. Castrignano SB, Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Brandão PE, Curti SP. Two novel circo-*like* viruses detected in human diarrheic feces: complete genome sequencing and electron microscopic analysis. *Virus Res*. 2013; 178: 364-73.