



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA  
COORDINADORA: DRA CELINA MONTEMAYOR**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO  
COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

## **"Sequenciamiento de Nova Geração na descoberta de novos agentes no sangue"**

**PROFESOR INVITADO: JOSÉ EDUARDO LEVI**

José Eduardo Levi estudió Ciencias Biológicas en la Universidad de São Paulo, Brasil. Obtuvo su maestría (1993) y su doctorado (2000) en la misma universidad, trabajando primero en la asociación de virus del papiloma humano y carcinomas de pene y más adelante en el desarrollo de un ensayo de PCR para el cribado de donantes de sangre para el ARN del virus de la hepatitis C. Desde 1996 es investigador asociado del laboratorio de Virología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de São Paulo. Actualmente es el coordinador de investigación y desarrollo en los laboratorios DASA, el laboratorio de patología clínica más grande de Brasil. Es miembro del comité de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT) y de la Sociedad Brasileña de Hematología y Hemoterapia (ABHH) y miembro del Comité Científico del Grupo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT). **dudilevi@usp.br**

## INTRODUÇÃO

Next-Generation Sequencing (NGS) é o nome dado às tecnologias de sequenciamento de DNA que se tornaram disponíveis a partir do novo milênio. Outros sinônimos são Sequenciamento de Nova Geração ou Sequenciamento Massivo Paralelo, nomes estes que refletem melhor as características desta tecnologia; nova geração para distinguir do sequenciamento de “velha” geração que usa o método de Sanger e massivo pela quantidade muito maior de dados genéticos obtidos por corrida, da ordem de milhões até bilhões de pares de bases, em contraste ao Sanger que fornece leituras da ordem de centenas a poucos milhares de pares de bases. O salto tecnológico foi gigantesco e permitiu a conclusão do sequenciamento completo do genoma humano em tempo menor que o previsto. Ao mesmo tempo, o custo do NGS vem caindo vertiginosamente, o que também torna o método mais acessível e popularizado. Se o primeiro genoma humano levou treze anos para ser concluído (1990-2003) a um custo aproximado de 3 bilhões de dólares, hoje o NGS permite o sequenciamento de um genoma humano completo em 48 horas a um custo de apenas 1.000 dólares. Como o avanço tecnológico continua, já se vislumbra o momento em que o NGS será um método laboratorial rotineiro e todo cidadão terá seu DNA sequenciado ao nascimento.

## METODOLOGIA

O NGS tem hoje enorme impacto na prática clínica, especialmente na genética humana e na oncologia. O exoma humano, conjunto de éxons presentes nos cerca de 20.000 genes de nosso DNA, é rotineiramente sequenciado em casos de síndromes genéticas e painéis com dezenas de genes são empregados em definições terapêuticas para diferentes tipos de câncer. A aplicação do NGS no estudo dos agentes infecciosos necessitou o desenvolvimento específico de *pipelines* de bioinformática para estes genomas diminutos. Nesse campo podemos definir desde já duas linhas distintas de investigação: o sequenciamento de genomas conhecidos, por exemplo, a vigilância genômica de SARS-CoV-2 e o sequenciamento “*unbiased*” de amostras biológicas, que se denomina **metagenômica** [1].

A metagenômica tem sido usada para o estudo da composição microbiana de diferentes materiais como solo, esgoto, água do mar e amostras biológicas de todos os tipos. No campo

médico a principal aplicação até o momento é na caracterização do microbioma fecal, especificamente seu componente bacteriano [2]. Nesse caso vale-se das sequências altamente conservadas do gene ribossomal 16S no reino bacteriano para a construção de uma biblioteca de amplicon empregando primers conservados deste gene. Desta forma, partindo-se de amostras de fezes é possível mapear e quantificar a diversidade bacteriana, o que tem forte associação com vários quadros clínicos. Aplica-se aí os conceitos de eubiose, quando a população bacteriana está em equilíbrio, seja na quantidade ou nos tipos de espécies bacterianas encontradas e disbiose, quando estão em desequilíbrio.

Já no reino dos vírus não se encontra sequer um gene homólogo para toda diversidade viral. Portanto, para a caracterização completa do Viroma torna-se necessário o uso do “*shotgun*” NGS, ou seja, métodos que devem capturar toda diversidade viral da amostra sem vieses. Resumidamente, estes métodos precisam eliminar todo componente não-viral, seja na etapa da extração do material genético da amostra, ou mesmo desprezando, após o NGS, todas sequências provindas do hospedeiro e de outros microorganismos não-virais. Obviamente, a segunda opção resulta em custos muito maiores, já que o percentual de sequências virais será sempre muito menor, até pelo tamanho destes genomas.

## O VIROMA DO SANGUE

Sendo o sangue o fluido biológico mais utilizado pela medicina laboratorial e a base da medicina transfusional, assim que foi possível, pesquisadores dedicaram-se a investigação do viroma do sangue humano, também pela importância que os vírus transmitidos pelo sangue ocupam na hemoterapia.

Os estudos transformaram a visão que se tinha do plasma como um fluido estéril, demonstrando que doadores saudáveis ou humanos em geral carregam normalmente alguns vírus de diferentes tipos [3,4,5], sendo os mais abundantes os Anellovírus [6,7] como o Torque Teno Vírus [TTV] e o TTV-Like Mini Vírus [TLMV], e em menor frequência os Pegvírus, gênero que inclui o HPgV-1 antes denominado Hepatitis G Vírus (HGV) ou GBV-C [3,4,5,8].

Os TTVs são vírus de DNA simples-fita encontrados em alta prevalência em doadores de sangue em um equilíbrio dinâmico, calculando-se uma produção diária de  $3.8 \times 10^{10}$  virions. Existe uma correlação evidente entre os níveis plasmáticos de TTV-DNA e o status imune, e por este

motivo a viremia por TTV tem sido explorada como marcador de imunossupressão [9]. Dada sua ubiquidade, o TTV-DNA tem sido usado até mesmo no monitoramento da qualidade da água [10].

Além destes vírus acima discutidos, encontra-se, como esperado, assinaturas de sequências derivadas dos Herpesvirus humanos como EBV, CMV, HHV6 e HHV7 [4,11]. Achados ocasionais de sequências de vírus oncogênicos como os Papilomavírus Humano (HPV) e o Poliomavírus do carcinoma de células Merkel (MPyV) [11] podem ser derivados da contaminação dos hemocomponentes pela pele do doador. No entanto, os tumores causados por estes pequenos vírus de DNA não-envelopados, carcinoma cervical e cutâneo respectivamente, não tem qualquer associação epidemiológica com a transfusão de sangue e uso de hemoderivados, ainda que os mesmos agentes também tenham sido encontrados na medula óssea [12]. Importante ressaltar neste ponto, que a detecção de material genético viral não permite inferir que se tratam de agentes com capacidade infecciosa; possivelmente o que se detecta são fragmentos de DNA/RNA derivados de infecções virais em outros órgãos/tecidos, que caem no sangue diretamente ou pela apoptose de células infectadas. De fato, o *shotgun*-NGS de plasma tem sido usado já de rotina como ferramenta para infecções de diagnóstico mais complexo, principalmente em pacientes submetidos à imunossupressão pós-transplante de medula alogênica [13].

## DESCOBERTA DE NOVOS AGENTES TRANSMISSÍVEIS POR TRANSFUÇÃO

O segundo aspecto que é relacionado ao título deste artigo, é o uso do NGS na descoberta de novos agentes transmissíveis por transfusão. Talvez a primeira demonstração da utilidade desta tecnologia neste contexto foi em um cluster de 3 óbitos de receptores de órgãos provindo de um mesmo doador. Estas 3 pacientes apresentaram doença febril após o transplante e testes para inúmeros agentes infecciosos foram todos negativos. O *shotgun*-NGS revelou sequências de um novo arenavírus, presente nas amostras das 3 receptoras falecidas [14]. Posteriormente, a comparação dos resultados desta metodologia em amostras pré e pós-transfusão de indivíduos politransfundidos identificou um novo Pegivírus humano, o HHpv-1/HPgV-2, além de comprovar a transmissão do TTV pela via transfusional e demonstrar que, nesse caso, os vírus presentes no doador eram infecciosos e replicaram no receptor [15]. A associação dos Pegvírus humanos com hepatite foi descartada já há muitos anos. Curiosamente, descreveu-se um papel benéfico destes na co-infecção

pelo HIV-1, reduzindo a carga viral do mesmo e retardando a progressão para AIDS. Como os HPgVs infectam linfócitos e tecido linfóide, uma possível relação causalidade em alguns tipos de linfomas vem sendo intensamente pesquisada, com resultados conflitantes [16].

## NAT X NGS

Dada a possibilidade do NGS em revelar todos os agentes infecciosos presentes no plasma (sangue), mas também simultaneamente a genética do hospedeiro, pode-se vislumbrar no futuro o uso rotineiro do mesmo na testagem de doadores de sangue. Embora o plasma seja pobre em DNA, contendo basicamente DNA fragmentado proveniente de células sanguíneas mortas, é suficiente para determinar, por NGS genótipos de importância na prática hemoterápica como o ABO, Rh, HLA, HPAs, HNAs e outros grupos sanguíneos [17]. Quanto aos agentes infecciosos, parece ser uma aplicação ainda mais vantajosa, pois em teoria pode substituir todos os NATs, a cultura bacteriana de plaquetas e ainda identificar agentes infecciosos para os quais não se faz *screening* além de microorganismos desconhecidos ou emergentes, como discutido acima. No entanto, nos dias de hoje, nas comparações feitas para agentes tradicionais como HIV, HBV e HCV, e também o próprio TTV, o NAT apresenta uma sensibilidade analítica superior ao NGS [5]. Acrescenta-se que o NGS tem um tempo de processamento longo, mínimo de 48-72 horas, incompatível com o funcionamento atual dos bancos de sangue, fluxo de trabalho num estágio de automação bastante inferior ao do NAT e custos muito mais elevados. Todas estas limitações tendem a ser equacionadas no futuro permitindo a incorporação do NGS na rotina de triagem de doadores de sangue.

## BIBLIOGRAFIA

1. Forbes JD, Knox NC, Peterson CL, Reimer AR. Highlighting Clinical Metagenomics for Enhanced Diagnostic Decision-making: A Step Towards Wider Implementation. (2018). *Comput Struct Biotechnol J*,16:108-120.
2. Ranallo RT, McDonald LC, Halpin AL, Hiltke T, Young VB. (2021). The state of microbiome science at the intersection of infectious diseases and antimicrobial resistance. *J Infect Dis*, 223(12 Suppl 2):S187-S193.
3. Sauvage V, Laperche S, Cheval J, Muth E, Dubois M, Boizeau L, et al. (2016). Viral metagenomics applied to blood donors and recipients at high risk for blood-borne infections. *Blood Transfus*, 14(5): 400–7.

4. Lau P, Cordey S, Brito F, Tirefort D, Petty TJ, Turin L, et al. (2017). Metagenomics analysis of red blood cell and fresh-frozen plasma units. *Transfusion*, 57(7): 1787–800.
5. Waldvogel-Abramowski S, Taleb S, Alessandrini M, Preynat-Seauve O. (2019). Viral metagenomics of blood donors and blood-derived products using next-generation sequencing. *Transfus Med Hemother*, 46(2):87-93.
6. Kaczorowska J, van der Hoek L. (2020). Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. *FEMS Microbiol Rev*, 44:305–13.
7. Huang LY, Oystein Jonassen T, Hungnes O, et al. (2001). High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. *J Med Virol*, 64: 381-6.
8. Review of human pegivirus: Prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication Yaqi Y, Zhenzhou W, Jian-Hua W, Xianguang Y, Zhang C. (2022). *Virulence*,13: 324–341
9. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. (2021). *Transpl Infect Dis*, e13778.
10. Ekundayo TC. Prevalence of emerging torque teno virus (TTV) in drinking water, natural waters and wastewater networks (DWNWWS): A systematic review and meta-analysis of the viral pollution marker of faecal and anthropocentric contaminations. (2021). *Sci Total Environ*, 771:145436.
11. Moustafa A, Xie C, Kirkness E, Biggs W, Wong E, Turpaz Y, et al. (2017). The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog*, 13(3):e1006292.
12. Toppinen M, Sajantila A, Pratas D, Hedman K and Perdomo MF. (2021). The human bone marrow is host to the DNAs of several viruses. *Front Cell Infect Microbiol*, 11:657245.
13. Goggin KP, Gonzalez-Pena V, Inaba Y, Allison KJ, Hong DK, Ahmed AA, et al. (2020). Evaluation of plasma microbial cell-free DNA sequencing to predict bloodstream infection in pediatric patients with relapsed or refractory cancer. *JAMA Oncol*, 6(4):552-556.
14. Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, Conlan S, Quan P-L, et al. (2008). A new Arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med*, 358:991-8.
15. Kapoor A, Kumar A, Simmonds P, Bhuvu N, Singh Chauhan L, Lee B, Sall AA, et al. (2015). Virome analysis of transfusion recipients reveals a novel human virus that shares genomic features with Hepaciviruses and Pegiviruses. *mBio*, 6(5):e01466-15.
16. Abraham J. Kandathil and Ashwin Balagopal. (2020). Human Hepegivirus-1: Innocent traveler, helpful symbiote, or insidious pathogen? *Clin Inf Dis*, 71(5):1229–31

17. Dezan MR, Dinardo CL, Bosi SAR, Vega S, Salles NA, Mendrone-Júnior A, Levi JE. (2016). High-throughput strategy for molecular identification of Vel-negative blood donors using leftover nucleic acids extracted from plasma pools used for viral NAT screening. *Transfusion*, 56(6):1430-4.