



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

**USO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO BASEADO
EM NANOPOROS PARA MANEJO DE SURTOS EPIDÊMICOS
CAUSADOS POR ARBOVÍRUS**

SALVADOR – BA
2019

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

**USO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO BASEADO
EM NANOPOROS PARA MANEJO DE SURTOS EPIDÊMICOS
CAUSADOS POR ARBOVÍRUS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do tí-
tulo de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Jaqueline Goes de Jesus

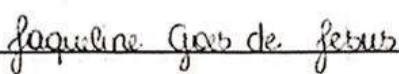
**SALVADOR – BA
2019**

ÍTALO ANDRADE BARBOSA LIMA

USO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO BASEADO EM
NANOPOROS PARA MANEJO DE SURTOS EPIDÊMICOS CAUSADOS POR
ARBOVÍRUS

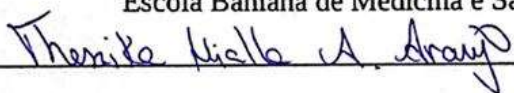
Este trabalho de conclusão de curso (TCC) foi julgado adequada à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 01 de novembro de 2019.



Profa. Dra. Jaqueline Goes de Jesus

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Profa. Dra. Thessika Hailla Almeida Araújo

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Profa. M.e Laise Eduarda Paixão de Moraes

Universidade Federal da Bahia

RESUMO

As técnicas de sequenciamento de nova geração têm se constituído uma ferramenta muito útil para a identificação, estudos da diversidade e da dispersão de arbovírus no mundo. Nos tempos recentes, diversos estudos utilizaram o sequenciamento baseado na tecnologia de nanoporos para o manejo de surtos virais. Essa revisão aborda as metodologias de sequenciamento de terceira geração que utilizam de nanoporos para investigação de surtos causados por arbovírus. Para tanto, foi realizada a busca de artigos publicados em bases indexadas que envolveram o uso de sequenciamento por nanoporos, no período de 2014 a 2019 onde foram selecionados, por critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, 13 artigos originais. Os estudos analisados mostraram que o MinION se tornou uma ferramenta muito útil para o sequenciamento genômico, principalmente em regiões com infraestrutura reduzida. Todavia, após análise das discussões, pode-se notar que o MinION ainda possui taxas de erro e falhas que poderiam ser cobertas se fossem empregadas outras técnicas de sequenciamento que não se utilizam de nanoporos.

Palavras-chave: Arboviroses, sequenciamento, nanoporos.

ABSTRACT

New generation sequencing techniques have been a very useful tool for the identification, studies of arbovirus diversity and dispersion in the world. In recent times, several studies have used sequencing based on nanopore technology for the management of viral outbreaks. This review addresses third-generation sequencing methodologies that use nanopores to investigate arbovirus outbreaks. For this, we searched for articles published in indexed databases that involved the use of sequencing by nanopores, from 2014 to 2019, with 13 original articles were selected by inclusion and exclusion criteria. Studies have shown that MinION has become a very useful tool for genomic sequencing, especially in regions with reduced infrastructure. However, after reviewing the discussions, it can be noted that MinION still has error and failure rates that could be covered if other non-nanopore sequencing techniques were employed.

Keywords: Arboviruses, sequencing, nanopores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 7

2 METODOLOGIA..... 9

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO: 10

4 CONCLUSÃO..... 14

5 REFERÊNCIAS 15

1 INTRODUÇÃO

Técnicas de sequenciamento são utilizadas para determinar a ordem da sequência de bases nucleotídicas de um fragmento genômico ou do genoma completo de um organismo (1). Os primeiros métodos de sequenciamento surgiram entre os anos de 1970 e 1980, tendo passado por diversos processos de aprimoramento e evolução desde então (2).

Nos primórdios das técnicas de sequenciamento, o método de Frederick Sanger foi o que se destacou e dominou a área por cerca de duas décadas (2). A técnica de Sanger se baseou no sequenciamento de uma cadeia de DNA onde a chave principal para o sucesso era a diferença entre a ação do desoxirribonucleotídeo (dNTP) e do didesoxirribonucleotídeo (ddNTP) (2). Enquanto o dNTP permite a continuação das inserções das bases nitrogenadas, o ddNTP impede que esse processo prossiga, dessa forma são sintetizadas fitas de DNA de tamanhos diferentes que são aplicadas em gel de eletroforese, de que os fragmentos de diferentes tamanhos possam ser ordenados e lidos, fornecendo assim, a ordem das bases nitrogenadas presentes na amostra (2).

Com o passar dos anos, o sequenciamento de primeira geração deu espaço às novas tecnologias como os sequenciadores de segunda e terceira gerações, tornando a atividade de sequenciar cada vez mais prática e com melhor qualidade, possibilitando também a análise de fragmentos maiores e a redução do tempo de execução(3). Além disso, alguns dispositivos mais modernos têm a vantagem da portabilidade, permitindo o uso da técnica de sequenciamento em locais remotos (3).

Um dos equipamentos capazes de realizar o sequenciamento de uma forma mais rápida e menos trabalhosa que a proposta de Sanger, é o MinION, lançado pela Oxford Nanopore Technologies, uma startup britânica que tem como proposta a tecnologia de sequenciamento portátil e em tempo real. Este equipamento opera com uma célula de fluxo (*flowcell*) onde ocorre o sequenciamento de fato (4). Dentro da *flowcell* existe uma membrana com uma enorme quantidade de nanoporos, ou seja, proteínas acopladas, responsáveis por realizar a “leitura” das bases nitrogenadas presentes nas fitas de DNA introduzidas no equipamento (4).

O MinION vem sendo utilizado para o sequenciamento de diversos patógenos de importância médica e de saúde pública em todo o mundo (5). Nos últimos anos, a tecnologia vem sendo muito utilizada no Brasil para estudo de surtos de arbovírus como Zika e Febre Amarela (5).

Os arbovírus são vírus que podem ser transmitidos por insetos e artrópodes, e pelo fato da sua replicação também acontecer neles, essa é uma classificação não taxonômica, sendo

inclusos espécies das famílias *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* que em sua maioria, são vírus de RNA (6). A origem da palavra arboviroses é inglesa e deriva de *Arthropod-borne virus* (7).

Os arbovírus, dentre outros vírus de importância epidêmica, têm se destacado como uma potente ameaça nas regiões tropicais, como a América do Sul, devido a sua forma de transmissão por insetos e artrópodes somada às condições climáticas e precariedade em saneamento nessas regiões (7). São vírus de grande relevância para a saúde pública pois apresentam manifestações clínicas severas e graves (6).

Levando em consideração que é muito importante para as investigações epidêmicas de arboviroses que os agentes causadores sejam identificados com eficácia e rapidez, esta revisão organizou estudos que utilizaram a tecnologia de nanoporos para sequenciamento genômico no manejo de surtos causados por arbovírus.

2 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão sistemática, baseada no protocolo PRISMA. A busca bibliográfica foi realizada através da base de dados do Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) onde a seguinte equação de busca foi utilizada: ("Arbovirus Infections/diagnosis"[Title/Abstract] OR "Arbovirus Infections/epidemiology"[Title/Abstract] OR "Arbovirus Infections/isolation and purification"[Title/Abstract] AND "sequence" AND "nanopore" OR "minion"[Title/Abstract])), no período de 01/11/2014 até 15/09/2019, após realizada a pesquisa, os artigos foram tabulados e triados conforme os critérios estabelecidos. Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão “uso de sequenciamento por nanoporos”, “estudo de surtos por arboviroses” e “período entre 01/11/014 e 15/09/2019” (Figura 1), foram excluídos os estudos que tratavam de metodologias de sequenciamento que não envolviam a técnica de nanoporos ou não tratavam de surtos causados por arbovírus.

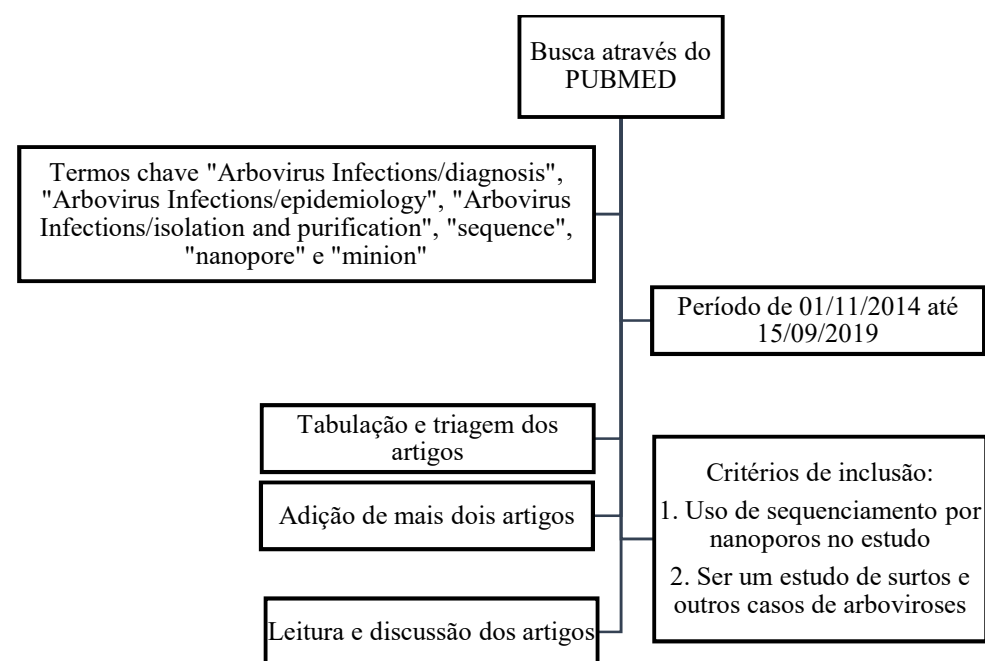


Figura 1. Fluxograma da metodologia utilizada no estudo. Atividades desenvolvidas por ordem de ocorrência de cima para baixo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram encontrados 324 artigos dos quais, 14 foram selecionados por estarem em concordância com os critérios de inclusão e apresentarem relevância no que tange o propósito para esta revisão (Tabela 1). Muitos estudos foram realizados com o propósito de mostrar a funcionalidade em utilizar o sequenciador portátil para auxiliar na vigilância genômica de arbovírus de importância em saúde pública.

Tabela 1. Artigos incluídos nesta revisão					
Título do Artigo	Autores	Ano de Publicação	Agente Viral Estudado	Técnica de Amplificação	Tecnologia de Sequenciamento
Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples	Kafetzopoulou LE, et. al.	2018	CHIKV DENV	PCR	Illumina MinION
Detection of Viral Pathogens With Multiplex Nanopore MinION Sequencing Be Careful With Cross-Talk	Xu Y, et. al.	2018	CHIKV DENV	-	MinION
Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas	Faria NR, et. al.	2017	ZIKV	PCR	MinION Illumina
Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing	Hayashida K, et. al.	2019	CHIKV	PCR LAMP	MinION
Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential	Faria NR, et. al.	2018	YFV	PCR	MinION
Genomic, epidemiological and digital surveillance of	Naveca FG, et. al.	2018	CHIKV	PCR	MinION

Chikungunya virus in the Brazilian Amazon						
Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing	Batovska J, et. al.	2017	CHIKV	PCR	MinION Illumina	
Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples	Quick J, et. al.	2017	ZIKV	PCR	MinION Illumina	
On-Site MinION Sequencing	Runtuwene LR, et. al.	2019	ZIKV	PCR	MinION	
Parallel ClickSeq and Nanopore sequencing elucidates the rapid evolution of defective-interfering RNAs in Flock House virus	Jaworski E, et. al.	2017	FHV	PCR	MinION Illumina	
Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis	Greninger AL, et. al.	2015	CHIKV	PCR	MinION Illumina	
Rapid Sequencing of Multiple RNA Viruses in Their Native Form	Wongsurawat T, et. al.	2019	ZIKV CHIKV MAYV VEEV VSV OROV	-	MinION	
Towards high quality real-time whole genome sequencing during outbreaks using Usutu virus as example	Oude Munnink BB, et. al.	2019	USUV	PCR	MinION Illumina	
Unbiased Strain-Typing of Arbovirus Directly from Mosquitoes Using Nanopore Sequencing: A Field-forward Biosurveillance Protocol	Russell JA, et. al.	2018	ZIKV	PCR	MinION	

O estudo realizado por Naveca e colaboradores, demonstrou o uso do MinION na região Amazônica, onde os dados obtidos mostraram um grande surto no Acre da linhagem *East-*

Central-South African (ECSA) do vírus Chikungunya, demonstrando a possibilidade de futuros surtos naquela região (8).

Entre 2016 e 2017, durante um surto com o vírus da Febre Amarela (YFV) aqui no Brasil, Nuno e colaboradores realizaram um trabalho onde foi possível sequenciar o genoma do YFV e caracterizar a sua transmissão se utilizando do MinION. Foi verificado, entre os estados com maiores números de casos, que houve uma transmissão do vírus entre primatas não-humanos que se expandiu até os humanos, durante uma epidemia (9).

Outro estudo realizado com seis diferentes vírus, Mayaro vírus (MAYV), Venezuelan Equine Encephalitis vírus (VEEV), Chikungunya vírus (CHIKV), Zika vírus (ZIKV), Vesicular Stomatitis Indiana vírus (VSV) e Oropouche vírus (OROV), comprovou a eficiência e rapidez do equipamento MinION, quando em apenas duas horas foram realizadas as sequências dos genomas dos vírus estudados (10).

Um projeto internacional que apresentou bastante expressividade foi o “Análise em tempo real do vírus Zika no Brasil” (ZIBRA). Neste estudo, os autores demonstraram o uso do MinION na geração de um grande número de genomas do ZIKV, contribuindo com o controle de surtos da doença no país (5).

O dispositivo MinION também já foi utilizado em estudos de metagenômica, permitindo a identificação de outro arbovírus, o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), que é um importante patógeno para as Américas, sendo capaz de causar encefalite aguda em humanos e animais, possivelmente levando-os a óbito (11). Estudos de metagenômica são realizados quando o patógeno é desconhecido, podendo auxiliar na identificação do agente causador de surtos (12).

Como alguns arbovírus possuem títulos virais baixos, como o ZIKV, é possível realizar o sequenciamento metagenômico do genoma inteiro potencialmente em campo (13). Além disso, o MinION e o Illumina apresentaram um desempenho comparável, com porcentagens do genoma de referência semelhantes, como no estudo com o ZIKV, realizado por Quick e colaboradores, que obteve uma cobertura de 97,7% do genoma do ZIKV na leitura realizada pelo MinION, já no sequenciamento Illumina apenas uma pequena porcentagem (<0,01%) das leituras se alinharam ao ZIKV e elas cobriam apenas uma fração do genoma (13).

Em adição, um trabalho realizado com o Usutu vírus (USUV) demonstrou também um desempenho comparável entre o MinION e Illumina, que originaram um genoma idêntico ao do genoma consensual, evidenciando que as taxas de erro de sequenciamento pelo MinION possuem um menor impacto no consenso de sequências para amostras com sequências de alta cobertura (14).

A utilização do MinION para lidar com genomas virais defeituosos, do tipo selvagem, foi realizada em um estudo com o vírus Flock House (FHV) para caracterizar a formação de

RNAs interferentes com defeitos (DI-RNAs), sendo possível observar o acúmulo desses DI-RNAs de forma rápida e que são caracterizados por diversas recombinações de RNA. O que reforça a importância da utilização dessa ferramenta para desvendar processos e evolução desses RNAs interferentes com defeito (15).

Em outro estudo é dito que o sequenciamento por nanoporos é de suma importância para a complementação do diagnóstico molecular como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (16). Porém o sequenciamento de terceira geração também pode ser combinado com outras técnicas de amplificação além da PCR, o *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) é uma técnica que se combinada com a transcriptase reversa provou tão eficaz quanto, além de ser mais viável que o PCR, já que, seu custo é bem inferior, sua técnica é mais simples e não se faz necessária a utilização de equipamentos de alto custo (17).

Apesar das diversas vantagens apresentadas, os estudos também reportam as desvantagens do sequenciamento por nanoporos. Um exemplo, é que apesar da metagenômica em sequências de vírus de RNA ter vários benefícios na saúde pública, essa técnica possui limitações, como o limite de detecção que é maior que o limite da técnica de qRT-PCR, assim, para diagnóstico o qRT-PCR possui um limite de detecção baixo (18).

As leituras realizadas pelo MiniON não possuem uma qualidade tão boa quanto outros sequenciadores como o Illumina MiSeq. O estudo para detecção metagenômica do arbovírus Ross River (RRV) diretamente do mosquito *Aedes notoscriptus* mostrou que o MiniON gerou menos leituras e com qualidade inferior ao MiSeq, com uma alta taxa de erro (4,7% comparado a 0,7% para o MiSeq) (19). Outro ponto é que o MinION apresenta problemas nas leituras quiméricas. Através da utilização do sequenciamento multiplex se utilizando do próprio MinION com os arbovírus da dengue e chikungunya e o vírus da Influenza A, foi possível mostrar a importância de filtrar cuidadosamente os dados a serem sequenciados antes da análise (20).

4 CONCLUSÃO

Os artigos aqui apresentados mostraram que o sequenciamento de terceira geração é eficaz quando se trata de sequenciamento das diversas arboviroses, mostrando também versatilidade a mais de um método de amplificação. Apesar de não ser a melhor tecnologia aplicável sempre, o MinION ainda se faz de grande importância, principalmente, por conta do pouco tempo utilizado para as leituras e da sua portabilidade, permitindo sequenciar genomas inteiros de maneira eficiente em locais de difícil acesso. Também possuindo desvantagens como seu limite de detecção baixo para fins diagnósticos, havendo outras técnicas melhores para essa finalidade, maiores taxas de erros na leitura, se comparado com outras tecnologias como o Illumina MiSeq e problemas com leituras quiméricas.

5 REFERÊNCIAS

1. Lopes J, Fietto R, Ferreira Maciel TE. Sequenciando genomas [Internet]. Riberao Preto; 2015 [cited 2019 Oct 22]. p. 403. Available from: <https://pt.scribd.com/document/331877905/Leandro-Moreira-Ciencia-genomica-fundamentos-e-aplicacoes>
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). Vol. 74. 1977.
3. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Oct 22];17(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
4. Andreia O, Turchetto-Zolet C, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19]. Available from: https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf#page=22
5. Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, De Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):406–10.
6. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2014 Sep;5(3):55–64.
7. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012 Sep;19(3):130–51.
8. Naveca FG, Claro I, Giovanetti M, de Jesus JG, Xavier J, Iani FC de M, et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;13(3):1–21.
9. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, De Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* (80-). 2018 Aug 31;361(6405):894–9.
10. Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Taylor MK, Lee J, Tolardo AL, Parvathareddy J, et al. Rapid sequencing of multiple RNA viruses in their native form. *Front Microbiol*. 2019;10(FEB):1–8.
11. Russell JA, Campos B, Stone J, Blosser EM, Burkett-Cadena N, Jacobs JL. Unbiased Strain-Typing of Arbovirus Directly from Mosquitoes Using Nanopore Sequencing: A

- Field-forward Biosurveillance Protocol. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23641-7>
12. Runtuwene LR, Tuda JSB, Mongan AE, Suzuki Y. On-Site MinION Sequencing. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1129:143–50.
 13. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples HHS Public Access Author manuscript. *Nat Protoc* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 19];12(6):1261–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902022/pdf/nihms956343.pdf>
 14. Oude Munnink BB, Kik M, de Bruijn ND, Kohl R, van der Linden A, Reusken CBEM, et al. Towards high quality real-time whole genome sequencing during outbreaks using Usutu virus as example. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;73(April):49–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.015>
 15. Jaworski E, Routh A. Parallel ClickSeq and Nanopore sequencing elucidates the rapid evolution of defective-interfering RNAs in Flock House virus. Vol. 13, *PLoS Pathogens*. 2017. 1–31 p.
 16. Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, et al. Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Med* [Internet]. 2015;7(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9>
 17. Hayashida K, Orba Y, Sequeira PC, Sugimoto C, Hall WW, Eshita Y, et al. Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(6):e0007480.
 18. Kafetzopoulou LE, Efthymiadis K, Lewandowski K, Crook A, Carter D, Osborne J, et al. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. *Eurosurveillance*. 2018;23(50):1–13.
 19. Batovska J, Lynch SE, Rodoni BC, Sawbridge TI, Cogan NO. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *J Virol Methods* [Internet]. 2017;249(June):79–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.019>
 20. Xu Y, Lewandowski K, Lumley S, Pullan S, Vipond R, Carroll M, et al. Detection of viral pathogens with multiplex nanopore MinION sequencing: Be careful with cross-Talk. *Front Microbiol*. 2018;9(SEP):1–7.