

Silvana Beres Castrignano
Teresa Keico Nagasse-Sugahara

Abordagem metagenômica e causalidade em virologia

The metagenomic approach and causality in virology

RESUMO

A abordagem metagenômica tem sido ferramenta muito importante atualmente na descoberta de novos vírus em amostras ambientais e biológicas. Aqui discutimos a maneira como essas descobertas podem ajudar a elucidar a etiologia de doenças e os critérios necessários para que a associação causal entre um vírus e uma doença seja estabelecida.

DESCRIPTORIOS: Metagenômica. Vírus. Virologia. Doenças Transmissíveis, etiologia. Causalidade. Postulados de Koch.

ABSTRACT

Nowadays, the metagenomic approach has been a very important tool in the discovery of new viruses in environmental and biological samples. Here we discuss how these discoveries may help to elucidate the etiology of disease and the criteria necessary to establish a causal association between a virus and a disease.

DESCRIPTORS: Metagenomics. Viruses. Virology. Communicable Diseases, etiology. Causality. Koch's Postulates.

Núcleo de Doenças Respiratórias. Centro de Virologia. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Correspondência | Correspondence:

Silvana Beres Castrignano
Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246-902 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: s.castrignano@hotmail.com

Recebido: 28/3/2014
Aprovado: 7/8/2014

Artigo disponível em português e inglês em:
www.scielo.br/rsp

INTRODUÇÃO

A associação entre um agente infeccioso e uma doença, antes de se tornar pública, deve estar muito bem embasada. Dela depende o tratamento dos pacientes acometidos por essa doença infecciosa, as medidas de prevenção, o estudo e compreensão das diferentes fases da doença, o desenvolvimento de terapêuticas e eventualmente até de vacina.¹³ Critérios para que essa associação seja feita corretamente têm sido propostos por eminentes cientistas.^{7,9-11,13,16,19}

Em relação aos vírus, foco deste comentário, a preocupação em estabelecer essa relação de causalidade é assunto bastante atual, pois estão sendo descobertos muitos vírus recentemente, descobertas estas impulsionadas principalmente devido às técnicas de metagenômica e às plataformas de sequenciamento de nova geração. Ao mesmo tempo, diversas doenças provavelmente infecciosas e grande porcentagem de casos de síndromes infecciosas comuns, como síndromes respiratórias agudas, encefalites, gastroenterites agudas e hepatites, não têm seu agente etiológico conhecido.^{12,16}

CRITÉRIOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AGENTES E DOENÇAS

Koch,¹¹ ao final do século XIX, defendeu princípios fundamentais para que a correlação entre microrganismos e doenças infecciosas fosse feita de forma criteriosa. Segundo esse autor, uma prova de causalidade necessita que um agente esteja presente em cada caso da doença, não seja encontrado em outras doenças e, após isolamento e cultivo, seja suficiente para reprodução da doença em um hospedeiro susceptível.

Desde então, foram propostos adendos e modificações a esses postulados, como: os vírus foram adicionados como agentes infecciosos, já que à época de Koch eles eram desconhecidos;^{7,19} foram introduzidas a importância do estudo de anticorpos (presença e época de aparecimento),¹⁹ a possibilidade de prevenção da doença em estudo com a vacina contra o vírus,¹⁰ a importância de estudos epidemiológicos,¹⁰ a concepção de que vários fatores, e não somente uma causa, podem atuar no desenvolvimento de uma doença.⁷

Devido aos avanços das técnicas de biologia molecular, a partir da década de 1980 as sugestões de atualização dos postulados de Koch mostram a inserção de critérios baseados em genética dos microrganismos.^{9,13,16} Entre essas proposições mais recentes, tanto os critérios de Mokili et al¹⁶ baseados na comparação de traços metagenômicos entre indivíduos doentes e indivíduos-controle, quanto os de Lipkin,¹³ que agrupou dados laboratoriais e clínico-epidemiológicos em três níveis de certeza para associação de patógenos a doenças, colocaram como critério para confirmação de causalidade

a inoculação do agente infeccioso em um indivíduo sadio – critério herdado dos postulados de Koch. No entanto, por questões éticas, não se pode inocular um agente suspeito de causar doença em seres humanos e, com exceções como o coronavírus humano relacionado à SARS, são raros os agentes que têm um modelo animal experimental susceptível a eles.² Lipkin¹³ sugeriu, além disso, uma alternativa a esse cumprimento dos postulados de Koch, dizendo que uma relação causal pode ser confirmada se a doença puder ser atenuada ou prevenida pelo uso de vacinas, drogas ou anticorpos específicos contra o microrganismo.

Por outro lado, nas diretrizes moleculares para estabelecimento da causa de doenças microbianas de Fredericks & Relman,⁹ não consta a necessidade de isolamento do vírus ou de sua inoculação em um hospedeiro. Essas diretrizes baseiam-se na demonstração do genoma microbiano por hibridização *in situ* em áreas com alteração patológica do tecido e na análise do número de cópias do genoma microbiano em tecidos com e sem lesão e em várias fases da doença, incluindo a avaliação do número de cópias de sequências do patógeno precedendo a doença.

Pelas dificuldades enfrentadas para aplicar os postulados de causalidade, é aceito que nem todos os critérios de um autor necessitem, obrigatoriamente, ser preenchidos.^{7,9-11,19} Na impossibilidade de preencher todos os critérios, serão importantes provas acumuladas ao longo do tempo e o bom senso dos pesquisadores para identificar o agente causal daquela doença.^{9,13,19}

METAGENÔMICA VIRAL

O termo “metagenômica” foi cunhado com o significado de análise do conjunto dos genomas microbianos de uma amostra ambiental, tanto do ponto de vista das sequências quanto das funções.¹⁸

O termo “metagenômica viral” tem sido utilizado quando o estudo avalia o genoma de todos os vírus existentes em amostras ambientais (e.g., água de lagos, água de reúso)^{5,20} ou biológicas (e.g., aspirados do trato respiratório, fezes humanas e de outros animais),^{14,17,28} nas quais se pressupõe presença de grande diversidade de vírus, e também quando a abordagem metagenômica é utilizada para a identificação do genoma de um provável vírus responsável por uma doença específica e/ou pelo efeito citopático em cultura de células, se várias técnicas usuais não conseguiram detectá-lo.^{24,30}

A abordagem metagenômica viral inclui vários passos: purificação e concentração das partículas virais (ou do ácido nucleico viral, se existir a possibilidade de o vírus estar na forma latente ou integrado ao genoma do

hospedeiro); extração de ácidos nucleicos; transcrição reversa de RNA para cDNA; amplificação randômica dos segmentos genômicos; sequenciamento dos fragmentos de ácidos nucleicos e análise das sequências com métodos de bioinformática.^{2,12,27} O sequenciamento desses fragmentos pode ser feito pela técnica de Sanger após clonagem ou em plataformas de sequenciamento de nova geração, que são mais sensíveis e passíveis de gerar quantidade muito maior de sequências em relação à clonagem em hospedeiro bacteriano.^{2,12,16,27}

DESCOBERTA DE VÍRUS ATRAVÉS DA METAGENÔMICA VIRAL

Apesar de a abordagem metagenômica estar contribuindo para o aumento a passos largos do número de vírus descobertos,¹⁶ o número de novas associações de vírus a doenças não tem ocorrido na mesma proporção. A associação causal depende não só do encontro do vírus em um paciente doente, mas da completa investigação da relação vírus-doença, com vistas a preencher os postulados de Koch ou os critérios que a estes se seguiram.

O uso da abordagem metagenômica em amostras ambientais já possibilitou descobertas de inúmeras novas sequências genômicas provavelmente derivadas de vírus. No entanto, somente esses dados dos novos genomas são insuficientes para identificar os hospedeiros e o potencial patogênico dos vírus. A catalogação desses genomas nas bases públicas de dados é importante para que no futuro, com resultados de mais pesquisas, sejam identificados os hospedeiros desses vírus.

Essa necessidade de investigação do verdadeiro hospedeiro e possível patogenicidade do vírus também é imperiosa quando encontramos um vírus, previamente desconhecido, em amostras de fezes e de secreções do trato respiratório superior. A presença do vírus nessas amostras, durante a fase aguda de uma doença, não o torna necessariamente agente responsável pela patologia. Pode ser o caso de detecção de um vírus que tenha excreção prolongada, e.g., enterovírus e bocavírus.²⁹ Além disso, um vírus detectado em fezes e amostras de secreção de vias respiratórias pode apenas ter sido inalado ou ingerido e ser um passageiro através do lúmen dos dutos do trato respiratório ou digestivo, sem se replicar naquele hospedeiro.^{3,12} O bocavírus humano exemplifica essa dificuldade em avaliar a associação de um vírus novo descoberto no trato respiratório a um quadro clínico. Descoberto em 2005 por abordagem metagenômica em um *pool* de amostras selecionadas aleatoriamente de aspirado nasofaríngeo,¹ o bocavírus tem sido alvo de inúmeras pesquisas desde então. Estas identificaram fatores que dificultam a associação do vírus com doença: a prevalência de infecção pelo bocavírus é alta, a excreção viral após a infecção é prolongada, o DNA viral pode permanecer no trato respiratório por vários meses, e a taxa de coinfeção é alta. Até o momento,

os resultados das pesquisas sugerem que o bocavírus é ora um passageiro, ora um patógeno em pacientes com doenças do trato respiratório.^{4,29}

Mesmo quando a abordagem metagenômica leva à detecção de um novo vírus em líquido cefalorraquidiano (LCR), um ambiente geralmente estéril, não se pode atribuir a doença ao vírus sem outras investigações.²⁶ Essa afirmação pode ser discutida com base nos achados recentes de Tan et al,²⁶ que encontraram um novo ciclovírus no LCR de dois pacientes com infecção aguda do sistema nervoso central. Depois da identificação desse novo vírus, Tan et al²⁶ detectaram-no em 4,0% de 642 amostras de LCR de pacientes com suspeita de infecção do sistema nervoso central e não o detectaram em nenhum dos 122 pacientes com doença neurológica não-infecciosa. O genoma viral também foi encontrado em fezes de crianças saudáveis, o que sugere uma rota de transmissão fecal-oral ou infecção via alimentos, e em fezes de animais, sugerindo a existência de reservatórios animais para esse vírus. Tan et al²⁶ afirmaram a impossibilidade, no atual estágio de conhecimento, de associar esse vírus à doença pelos critérios de Koch ou pelas versões adaptadas dos mesmos. Para avançar nessa avaliação de causalidade, Tan et al²⁶ estão buscando o isolamento do vírus em cultura de células ou modelo animal e a detecção de uma resposta imune específica. Essa cautela é justificável, pois um vírus encontrado no LCR pode ser um agente coinfectante – que teria papel secundário na patologia e que poderia aumentar a gravidade da doença ou facilitar a entrada de outros patógenos –, um vírus que estava latente e foi reativado devido ao processo infeccioso/inflamatório da doença ou ainda simplesmente refletir detecção de um vírus latente.^{6,22,23,26} Essa discussão é comum em casos de detecção no LCR de herpesvírus humanos que são disseminados pela via hematogênica, como o Epstein-Barr e o Herpesvírus humano 6.^{6,22,23} Poderiam ainda ser vírus como os anelovírus, que estabelecem infecções produtivas crônicas, talvez não sejam patogênicos (podem ser componentes da microflora humana normal) e podem ser encontrados no sistema nervoso central, no sangue e em vários outros fluidos corpóreos.¹⁵

Vírus também podem ser detectados por abordagem metagenômica em doenças crônicas, mas a associação de causalidade pode ser ainda mais difícil,²⁷ como se constata pelos inúmeros dados envolvendo o poliovírus de célula Merkel (MCV). Identificado em amostras de carcinoma humano de célula Merkel (MCC),⁸ a investigação da associação do MCV com essa doença iniciou-se com a pesquisa de dez amostras de MCC de diferentes pacientes, sendo que em oito delas foi detectado o genoma viral. Em 75,0% dessas amostras, o DNA viral estava integrado ao genoma do tumor em um padrão clonal, sugerindo que a infecção e a integração precederam a expansão clonal das células

tumorais. Tecidos-controle testados foram positivos para o genoma de MCV em porcentagem expressivamente menor, e houve evidências de que o número de cópias do genoma viral nas amostras positivas também era menor do que nas amostras do MCC.⁸ Estudos posteriores confirmaram presença do MCV em alta porcentagem dos casos de MCC em vários países, exceto em pacientes da Austrália.²¹ Sabe-se atualmente que a infecção humana com o MCV ocorre cedo, uma vez que a soroprevalência é de 50,0% para pessoas abaixo de 15 anos.²¹ Estudos com RNA de interferência e de avaliação das alterações genéticas do genoma viral integrado a células do MCC trouxeram evidências de que o MCV talvez contribua para o desenvolvimento do MCC.²¹

No caso de novo vírus detectado em sangue de paciente com uma síndrome provavelmente infecciosa, somente o encontro de um novo agente também não define a associação com a doença, como pode ser exemplificado pela descoberta de um novo bunivírus na China. Esse novo bunivírus denominado vírus HNF (*Henan fever virus*)³⁰ ou SFTSV (*Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus*)³¹ foi detectado quase simultaneamente por dois grupos por abordagem metagenômica em soro³⁰ ou leucócitos do sangue,³¹ obtidos durante a fase aguda de síndrome que cursa com febre, trombocitopenia e leucopenia. Associada a essa descoberta, foi feita extensa pesquisa epidemiológica, clínica e laboratorial. No laboratório, as linhas de evidência da associação incluíram isolamento do vírus com posterior

visualização de sua morfologia por microscopia eletrônica, detecção do genoma viral e sorologia positiva em amostras dos pacientes.^{30,31} Nos dois trabalhos foram analisados também grupos-controle. Ao discutir a relação de causalidade entre o vírus HNF e a síndrome grave com febre e trombocitopenia, os dois grupos se referiram aos postulados de Koch e concluíram que, apesar de não os terem preenchido, são fortes as evidências da associação.^{30,31} O fato de investigadores independentes terem confirmado os resultados^{25,30,31} corrobora a potencial associação, como sugerem os critérios de Lipkin.¹³

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metagenômica viral tem mostrado grande impacto na descoberta de novos vírus, pelas suas características de possibilitar a detecção de todos os genomas virais presentes em uma amostra, e por independência de antissoros, de conhecimento prévio do genoma viral (diferentemente de outras técnicas de biologia molecular como PCR, *microarray* e *hibridização in situ*) e de isolamento em cultura de células.^{2,16,27}

A relação de causalidade entre um vírus e uma doença no homem e outros animais, no entanto, continua dependendo de um conjunto de investigações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, do uso de critérios estritos para associá-los, como os postulados de Koch e os que dele advieram, e do bom senso dos pesquisadores ao analisar esses dados.^{9,10,12,13,16,19}

REFERÊNCIAS

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(36):12891-6. DOI:10.1073/pnas.0504666102
- Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol*. 2006;16(6):365-83. DOI:10.1002/rmv.515
- Castrignano SB, Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Brandão PE, Curti SP. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. *Virus Res*. 2013;178(2):364-73. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.09.018
- Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J*. 2012;9:247. DOI:10.1186/1743-422X-9-247
- Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One*. 2009;4(9):e7264. DOI:10.1371/journal.pone.0007264
- Doja A, Bitnum A, Jones ELF, Richardson S, Tellier R, Petric M, et al. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol*. 2006;21(5):384-91. DOI:10.2310/7010.2006.00114
- Evans AS. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med*. 1976;49(2):175-95.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319(5866):1096-100. DOI:10.1126/science.1152586
- Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(1):18-33.
- Huebner RJ. Criteria for etiologic association of prevalent viruses with prevalent diseases; the virologist's dilemma. *Ann N Y Acad Sci*. 1957;67(8):430-8.
- Koch R. An address on bacteriological research. *Br Med J*. 1890;2(1546):380-3.
- Li L, Delwart E. From orphan virus to pathogen: the path to the clinical lab. *Curr Opin Virol*. 2011;1(4):282-8. DOI:10.1016/j.coviro.2011.07.006
- Lipkin WI. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(2):133-41. DOI:10.1038/nrmicro2949

14. Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner A, Fahlander K, et al. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PLoS One*. 2012;7(2):e30875. DOI:10.1371/journal.pone.0030875
15. Maggi F, Bendinelli M. Human anelloviruses and the central nervous system. *Rev Med Virol*. 2010;20(6):392-407. DOI:10.1002/rmv.668
16. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol*. 2012;2(1):63-77. DOI:10.1016/j.coviro.2011.12.004
17. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002218. DOI:10.1371/journal.ppat.1002218
18. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*. 2004; 38:525-52. DOI:10.1146/annurev.genet.38.072902.091216
19. Rivers TM. Viruses and Koch's postulates. *J Bacteriol*. 1937;33(1):1-12.
20. Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, Breitbart M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ Microbiol*. 2009;11(11):2806-20. DOI:10.1111/j.1462-2920.2009.01964.x
21. Schrama D, Ugurel S, Becker JC. Merkel cell carcinoma: recent insights and new treatment options. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(2):141-9. DOI:10.1097/CCO.0b013e32834fc9fe
22. Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(3):237-48. DOI:10.1080/0036554005016585
23. Sundén B, Larsson M, Falkeborn T, Paues J, Forsum U, Lindh M, et al. Real-time PCR detection of human herpesvirus 1-5 in patients lacking clinical signs of a viral CNS infection. *BMC Infect Dis*. 2011;11:220. DOI:10.1186/1471-2334-11-220
24. Svraka S, Rosario K, Duizer E, Avoort H, Breitbart M, Koopmans M. Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 11):2846-56. DOI:10.1099/vir.0.024612-0
25. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J Infect Dis*. 2014;209(6):816-27. DOI:10.1093/infdis/jit603
26. Tan LV, Doorn HR, Nghia HDT, Chau TTH, Tu LTP, Vries M, et al. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. *MBio*. 2013;4(3):e00231-13. DOI:10.1128/mBio.00231-13
27. Tang P, Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol*. 2010;5(2):177-89. DOI:10.2217/fmb.09.120
28. 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(9):4642-51. DOI:10.1128/JVI.02301-08
29. Williams JV. Déjà vu all over again: Koch's postulates and virology in the 21st century. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1611-4. DOI:10.1086/652406
30. 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(11):e1002369. DOI:10.1371/journal.ppat.1002369
31. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 2011;364(16):1523-32. DOI:10.1056/NEJMoa1010095

Os autores declaram não haver conflito de interesses.