

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
INSTITUIÇÃO SEDE: HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-TRONCO  
E TERAPIA CELULAR

VICTÓRIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise  
do metagenoma viral**

RIBEIRÃO PRETO  
2023

VICTÓRIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise  
do metagenoma viral**

Dissertação apresentada ao Hemocentro de  
Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Oncologia Clínica, Células-  
Tronco e Terapia Celular

Orientador: Dr. Svetoslav Nanev Slavov

Ribeirão Preto  
2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

Zucherato, Victória Simionatto

Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise do metagenoma viral / Victória Simionatto Zucherato - Ribeirão Preto - 2023

69 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Dr. Svetoslav Nanev Slavov

1. Metagenômica 2. Vírus 3. Nanoporos 4. Padronização 5. Pré-processamento

VICTÓRIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise do metagenoma viral**

Dissertação apresentada ao Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre

**Aprovado em:**

---

Prof. Dr.

---

Data

---

Prof. Dr.

---

Data

---

Prof. Dr.

---

Data

### **Suporte Financeiro:**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Processo nº 88887.653317/2021-00 do Programa Demanda Processo Social; com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil - Processo nº 381945/2023-5; e o apoio da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 2021/09446-8

### **Suporte Administrativo:**

Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Silvia e ao meu irmão, Adolpho, que me apoiaram durante todo o período de Mestrado e que me apoiam em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto por todo suporte administrativo e de infraestrutura.

Às agências de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro durante o período de Mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Svetoslav Nanev Slavov, pela oportunidade de tantos ensinamentos profissionais e pessoais, pela disposição e paciência em me orientar e me auxiliar em todos os momentos do desenvolvimento deste projeto, pela segurança, determinação e competência em que me acompanhou. Sempre serei muito grata!

À Rochele Azevedo França, Gerente do Laboratório NAT do Hemocentro de Ribeirão Preto, por ter fornecido todas as amostras utilizadas neste projeto e pelo suporte.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e ao Laboratório de Transferência Gênica por toda infraestrutura laboratorial e suporte.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Bioinformática, Ian, Rafael, Lara, Anielly, Marlon, Thuany e Gabriel e aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Débora, Jonathan, Péricles, Felipe, Fernanda, Juliana, Elaine, Josiane, Mariane e Yasmin, por sempre estarem dispostos a me ajudar e pela companhia de todos os dias.

À Dra. Simone Kashima Haddad e a Dra. Evandra Ribeiro, por todo suporte dentro e fora do laboratório e por todos os ensinamentos.

À Carmen, à Rosana e à Silvia, por todo suporte administrativo.

Às valiosas contribuições da banca do Exame de Qualificação, formada pela Dra. Tathiane Malta da FCFRP-USP, pelo Dr. Maurício Teixeira Lima, do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-Minas) e pela Dra. Simone Kashima Haddad.

À toda equipe Hemocentro de Ribeirão Preto por todo apoio.

À minha família e amigos por todo suporte e por estarem ao meu lado durante a realização deste projeto.

## RESUMO

### **Aplicação da tecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise do metagenoma viral**

As tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (SNG) mostraram um crescimento acelerado nos últimos anos. Uma das principais aplicações do SNG é a metagenômica, que identifica patógenos emergentes para os quais não há diagnóstico estabelecido. Uma técnica promissora e de custo relativamente baixo é a tecnologia portátil MinION. Um dos maiores problemas da plataforma MinION é a falta de protocolos otimizados (pré-preparo da amostra, concentração viral, extração e amplificação). Portanto, o objetivo desse trabalho é padronizar e otimizar os procedimentos de metagenômica viral aplicados ao sequenciamento de nanoporos. O controle do sequenciamento foi realizado utilizando vírus RNA (bolsa de sangue positiva para HIV, *cycle threshold* - Ct=25,8) e vírus DNA (citomegalovírus humano cultivado). Estes controles foram utilizados para padronizar os processos de concentração viral, extração e preparo de bibliotecas metagenômicas. Inicialmente, após a degradação enzimática do material do hospedeiro, foi realizada a concentração viral por ultracentrifugação, que foi conseqüentemente confirmada com microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, foi realizada a concentração viral por método químico utilizando poliacrilamida linear. As amostras concentradas foram extraídas com dois kits diferentes a fim de comparação: QIAamp UltraSens Virus (QIAGEN) e High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche Life Science). Em seguida, comparamos diferentes métodos de fragmentação do DNA: fragmentação mecânica (Covaris), fragmentação química (endonucleases), amplificação pelo sistema de primer SMART-9N e amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos. Todas as amostras foram sequenciadas utilizando a *flow cell* 9.4.1 no dispositivo MinION. Na microscopia eletrônica de transmissão visualizamos várias partículas de HIV (tamanho esperado 80-100 nm) bem como uma abundância de fagos, que mostrou a importância da concentração viral. Em seguida, a análise bioinformática revelou que as amostras concentradas por LPA, extraídas pelo kit QIAamp UltraSens Virus e amplificadas pelo método SMART-9N apresentaram maior abundância viral e número elevado de leituras dos vírus tidos como controles (HIV e CMV). Portanto, propusemos que a metagenômica por sequenciamento de nanoporos seja feita utilizando esses métodos e concluímos que a padronização de todos os procedimentos de pré-processamento de amostras é crucial para melhores resultados de sequenciamento utilizando a tecnologia MinION, que permitirá sua aplicação na área de metagenômica viral e na descoberta de patógenos virais desconhecidos ou reemergentes.

**Palavras chaves:** Metagenômica, Vírus, Nanoporos, Padronização, Pré-Processamento.



## **ABSTRACT**

### **Optimization of portable MinION sequencing technology for viral metagenome analysis**

Next Generation Sequencing (NGS) technologies have shown accelerated growth in the recent years. One of the main applications NGS is metagenomics, which identifies emerging pathogens without established diagnosis. A promising and relatively low-cost technique is the portable MinION technology. One of the main problems of the MinION platform is the lack of optimized protocols (sample pre-preparation, viral concentration, extraction and amplification). Therefore, the objective of this work is to optimize viral metagenomics procedures applied to nanopore sequencing. We used two types of controls: for RNA viruses a blood unit of plasma obtained from HIV-positive blood donor with cycle threshold of Ct=25.8 and for DNA viruses: cultivated human cytomegalovirus (HCMV). These controls were used as a positive control to optimize the processes of viral concentration, extraction and preparation of metagenomic libraries. Initially, after enzymatic host nucleic acids degradation, viral concentration was performed by ultracentrifugation, which was subsequently confirmed with transmission electron microscopy. In addition, viruses were also concentrated by chemical method using linear polyacrylamide (LPA). Concentrated samples were extracted by two different strategies that were compared: QIAamp UltraSens Virus (QIAGEN) and High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche Life Science). Subsequently, we compared different DNA fragmentation methods: mechanical fragmentation (Covaris), chemical fragmentation (endonucleases), amplification by the SMART-9N primer system and isothermal amplification without ligation. All samples were sequenced using flow cell 9.4.1 on the MinION device. The transmission electron microscopy showed the presence of HIV particles (expected size 80-100 nm) and abundance of phages, revealing its adequacy for viral concentration. The bioinformatic analysis revealed that the samples concentrated by LPA, extracted by the QIAamp UltraSens Virus kit and amplified by the SMART-9N method, showed higher viral abundance and a high number of HIV and HCMV reads. Therefore, we propose that nanopore sequencing metagenomics might be performed including the aforementioned steps and we conclude that the optimization of all sample pre-processing procedures is crucial for better sequencing results using MinION technology, allowing its application in the area of viral metagenomics and in the discovery of emerging or reemerging viral pathogens.

**Keywords:** Metagenomics, Viruses, Nanopores, Optimization, Pre-Processing.

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Oligos utilizados no protocolo de amplificação SMART-9n (Morales e Quick, 2019).....   | 30 |
| Tabela 2. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de fragmentação química por endonucleases.....  | 39 |
| Tabela 3. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de fragmentação mecânica por g-tube Covaris.....  | 39 |
| Tabela 4. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos.....  | 40 |
| Tabela 5. Quantidade de leituras virais nas amostras diferentemente concentradas e extraídas do método SMART-9N.....   | 41 |
| Tabela 6. Quantidade de leituras virais nas amostras de cultivo de CMV amplificadas pelo método SMART-9N e nas amostras com DNA fragmentado por endonucleases..... | 43 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Mapa mundial indicando a localização das principais infecções emergentes e reemergentes .....  | 14 |
| Figura 2. Imagens de sequenciadores.....   | 18 |
| Figura 3. Fluxograma dos métodos do projeto apresentado.....   | 23 |
| Figura 4. Distribuição da coleta de amostras clínicas de doadores positivos para as infecções de triagem obrigatória nos bancos de sangue brasileiros..... | 25 |
| Figura 5. Ultracentrífuga Optima L-100K Beckman Coulter.....   | 26 |
| Figura 6. Estrutura química da poliacrilamida linear (GenElute LPA) .....  | 26 |
| Figura 7. Imagem da microscopia eletrônica da amostra positiva para HIV concentrada em ultracentrifugação.....   | 35 |
| Figura 8. Imagem da microscopia eletrônica da amostra positiva para HIV concentrada em ultracentrifugação.....   | 36 |
| Figura 9. Foto de acervo pessoal mostrando os grumos de beads formados.....  | 37 |
| Figura 10. Abundância viral pela fragmentação química por endonuclease.....  | 39 |
| Figura 11. Abundância viral pela fragmentação mecânica por g-tube Covaris.....   | 40 |
| Figura 12. Abundância viral pelo método de amplificação isotérmica sem ligação.....  | 41 |
| Figura 13. Abundância viral pelo método de amplificação SMART-9n.....  | 42 |
| Figura 14. Abundância viral comparando todos os métodos de fragmentação.....   | 42 |
| Figura 15. Abundância viral na amostra controle de CMV com geração de fragmentos pelo método SMART-9n.....   | 43 |
| Figura 16. Abundância viral na amostra controle de cultivo de CMV com fragmentação do DNA por endonucleases.....   | 44 |
| Figura 17. Fluxograma final da metodologia aplicada nas amostras clínicas.....   | 45 |
| Figura 18. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HBV.....  | 46 |

Figura 19. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HBV.....46

Figura 20. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HBV.....47

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>14</b> |
| 1.1. Vírus emergentes.....  | 14        |
| 1.2. Viroses emergentes e transfusão sanguínea.....   | 15        |
| 1.3. Tecnologias de sequenciamento de última geração e metagenômica.....  | 17        |
| <b>2. JUTIFICATIVA.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3. OBJETIVO PRINCIPAL.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>4. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>23</b> |
| 5.1. Fluxograma.....  | 23        |
| 5.2. Amostras clínicas.....   | 24        |
| 5.3. Otimização do processo de sequenciamento de última geração com finalidade metagenômica utilizando Oxford Nanopore..... | 25        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b> |
| 6.1. Concentração de partículas virais: avaliação de concentração através de microscopia eletrônica.....                    | 35        |
| 6.2. Testes iniciais de aplicação da metagenômica no sequenciamento nanopore MinION.....                                    | 36        |
| 6.3. Amostras clínicas.....   | 44        |
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>10. APÊNDICE.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>11. ANEXO.....</b>   | <b>66</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Vírus emergentes

As infecções virais emergentes apresentam um dos maiores desafios da atualidade, tanto em termos de diagnóstico como na identificação e manejo e isso foi claramente demonstrado pelos efeitos que ainda a sociedade sofre da pandemia da Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2, SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). As infecções virais emergentes podem ser definidas como aquelas que surgem recente ou repentinamente ou seus índices de disseminação estão aumentando rapidamente a incidência e alcance geográfico. Esses vírus podem ser totalmente desconhecidos ou podem estar circulando em níveis insignificantes em uma população específica, mas devido algum fator (aquisição de mutação específica, fitness viral entre outros) estão se espalhando para novas regiões ou infectando novos hospedeiros (Stramer et al., 2009). Na figura 1 é possível observar os dados sobre o local de surgimento de alguns dos vírus emergentes mais importantes. O surgimento de vírus emergentes pode estar relacionado a diversos fatores, sendo eles: transmissão zoonótica - quando humanos entram em contato com animais que carregam o agente viral (consumo de animais, agricultura, caça); globalização - favorece disseminação fácil dos agentes virais (rápida disseminação do SARS-CoV-2 pelo globo); fatores ambientais e climáticos - podem alterar a distribuição de vetores transmissores; evolução e recombinação genética - mutações que levam ao surgimento de novas cepas mais infecciosas ou até mesmo vírus (Dennehy et al., 2017).



Figura 1. Mapa mundial indicando a localização das principais infecções emergentes e reemergentes (Fonte: Mukherjee S, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618832/>)

Os vírus emergentes representam uma ameaça significativa para a saúde pública, visto que tratamentos e vacinas eficazes muitas vezes não estão disponíveis quando há surtos. Isso foi claramente observado durante as fases iniciais da disseminação do SARS-CoV-2, quando a letalidade era alta e as medidas de combate a esta infecção eram apenas não farmacológicas, como o uso de máscaras (Ueki et al., 2020), isolamento social e lavagem constante das mãos (Sharma, Farouk e Lal., 2021). Dessa maneira, é importante monitorar e rastrear esses agentes para ter conhecimento sobre sua disseminação e, assim, desenvolver estratégias de prevenção e controle. Entretanto, um dos maiores desafios para a comunidade científica é a falta de recursos técnicos e científicos para entendimento dos vírus emergentes, como dados genômicos suficientes, infraestrutura adequada que atinjam locais remotos onde geralmente com maior frequência acontecem estes surtos.

## **1.2. Viroses emergentes e transfusão sanguínea**

A transfusão de sangue pode ser uma rota potencial de transmissão para vírus emergentes, principalmente aqueles que apresentam fase de viremia. Em termos históricos, o vírus da imunodeficiência humana – HIV (em inglês, *Human immunodeficiency virus*) foi, na década de 1980, um vírus emergente que apresentou grande impacto na segurança transfusional e moldou as estratégias de diagnóstico obrigatório viral e doação de sangue nos serviços de hemoterapia no mundo todo. Inicialmente, a transmissão por transfusão do HIV foi identificada em pacientes com hemofilia, recipientes de fatores de coagulação derivados do plasma de doadores de sangue. Durante os primeiros anos da epidemia do HIV, não havia testes de triagem para o vírus, o que fez com que alguns dos concentrados de fator de coagulação estivessem contaminados, resultando na transmissão do HIV para pacientes com hemofilia (Evatt, 2006). A identificação desta rota de transmissão viral teve um papel crucial no desenvolvimento de métodos de testes de triagem diagnóstica altamente sensíveis em doações sanguíneas para garantir a segurança transfusional, resultando na diminuição do risco de transmissão do HIV e outras infecções virais por transfusão.

Na atualidade, a tiragem de vírus na rotina nos bancos de sangue, que combina testes sorológicos e moleculares, é responsável por um risco residual transfusional extremamente baixo para infecções, tais como HIV, vírus da hepatite B – HBV (do inglês, *Hepatitis B virus*), vírus da hepatite C – HCV (do inglês, *Hepatitis C virus*) e, em alguns países, o vírus T-linfotrófico humano – HTLV (do inglês, *Human T-cell leukemia virus*) (Grubyte et al., 2019). Isto é observado em vários países, inclusive aqueles com alta incidência de HIV como os países

africanos, e especialmente a África do Sul que possui um dos índices mais altos de infecção por HIV do planeta (Vermeulen et al., 2019).

A identificação de infecções virais transmitidas via transfusão na fase de viremia curta e preferencialmente transmitidas por vetores artrópodes mostrou que viroses exóticas podem impactar a hemoterapia e ter impacto clínico nos receptores (Slavov et al., 2022). Como exemplo, as arboviroses apresentam grandes surtos, porém alta porcentagem de infecções assintomáticas, que pode levar a contaminação dos derivados sanguíneos por doadores sem sintomas. Um dos primeiros arbovírus que foi envolvido na transmissão transfusional foi o vírus do Nilo Ocidental ou *West Nile Virus* em inglês (WNV), que causou grande surto nos EUA e, conseqüentemente, foi posicionado entre os vírus de triagem obrigatória nos bancos de sangue nesse país (Biggerstaff et al., 2002) junto ao HIV, HCV e HBV. O vírus da dengue – DENV (do inglês, *Dengue virus*) é o mais importante (Custer et al., 2022) e sua transmissão pode trazer complicações aos pacientes que receberam transfusão (Sabino et al., 2016). Além disso, o vírus da encefalite japonesa – JEV (do inglês, *Japanese encephalitis virus*) tem importância clínica, podendo causar encefalite (Cheng et al., 2018) inclusive em pacientes recebendo transfusão, em alguns casos relacionado a óbito, e o vírus da febre Zika – ZIKV (do inglês, *Zika virus*) também pode participar na transmissão transfusional, porém sem efeitos clínicos (Motta et al., 2016). Existem outras diversas infecções vírus em que há suspeita de transmissão via transfusão sanguínea, como o parvovírus humano B19 – HPV B19 (do inglês, *Human parvovirus B19*), o gamaherpesvírus humano 8 – HHV-8 (do inglês, *Human gammaherpesvirus 8*) e o vírus influenza aviário – AI (do inglês, *Avian influenza virus*) (Alter et al., 2007). O vírus responsável pela pandemia da covid-19, também é alvo de investigação de impacto na transfusão sanguínea. Até o momento, os estudos buscam entender sua prevalência pós-doação (Cappy et al., 2022) e ainda possuem evidências limitadas sobre a sua transmissão transfusional, mas como se trata de vírus respiratório é muito provável que a transmissão transfusional não seja via efetiva de transmissão desse agente viral (Mawalla et al., 2021).

A identificação de vírus emergentes é muito importante para o seu controle, pois permite identificar suas rotas de transmissão e relacionar ao seu possível quadro clínico; entretanto, é um desafio já que nenhuma característica destes vírus é conhecida como por exemplo a organização genômica. Os métodos de identificação clássicos incluem: cultivo em linhagens celulares, que consiste na inoculação do material em cultivos celulares suscetíveis estimulando a multiplicação viral e, conseqüentemente, efeito citopático; testes sorológicos, em que o antígeno viral presente na amostra infectada reage com anticorpos específicos produzindo reação química ou fluorescência (quimioluminescência); microscopia eletrônica, utilizada para



visualização da simetria das partículas virais em amostras biológicas. No entanto, estes métodos são pouco sensíveis e apresentam grande viés diagnóstico. Por outro lado, a aplicação de métodos moleculares é uma maneira adequada para detectar vírus emergentes, porém não é aplicável para vírus sem conhecimentos prévios sobre a organização genômica, o que é o caso com as viroses emergentes.

### **1.3. Tecnologias de sequenciamento de última geração e metagenômica**

Com o avanço científico e tecnológico, tecnologias moleculares de alta complexidade foram desenvolvidas para a obtenção de informações genéticas rápidas e precisas. A partir do sequenciamento de nova geração, que permite a geração de fragmentos de DNA de forma simultânea, imparcial e sem precisar de conhecimento prévio do agente viral (Gu et al., 2018), a metagenômica tornou-se o método principal de identificação de vírus emergentes. Essa técnica permite a caracterização de todo o material genético de uma amostra clínica, e assim representa uma análise completa do microbioma, do genoma e do transcriptoma em diversas amostras obtidas de pacientes, dependendo do foco do estudo (Chiu e Miller, 2019). A metagenômica é uma ferramenta com importantes aplicações para a saúde pública, já que envolve a vigilância e o monitoramento de surtos de doenças infecciosas e especialmente aqueles de caráter desconhecido. A utilização dessa técnica pode auxiliar além da identificação de vírus emergentes, demonstrar cadeias de transmissão, taxas evolutivas e mutações específicas dos agentes encontrados. Dessa forma, o acesso a essas informações através da metagenômica pode oferecer uma visão completa de quando, onde e como uma epidemia pode surgir (ou surgiu), permitindo a intervenção rápida e precisa para evitá-la ou interromper a disseminação (Rose et al., 2016).

A primeira tecnologia de sequenciamento de nova geração que foi comercializada em 2005, pela Roche, foi a plataforma Roche 454 (Figura 2a). Esta plataforma utiliza o método na base de pirosequenciamento, que é definido como a detecção de luz resultante da liberação de pirofosfato inorgânico durante a adição de nucleotídeos (Ronaghi et al., 1996). A maior vantagem da plataforma Roche 454 é sua alta velocidade comparada com o sequenciamento convencional, embora na época foi uma tecnologia de alto custo e possuía uma margem de erro alta em sequências maiores de 6 kb (Liu et al., 2012). Atualmente, os sequenciadores de última geração podem ser divididos em duas categorias: de 2ª geração (incluindo Roche 454, Illumina e Ion Torrent) que geram leituras relativamente curtas e de 3ª geração (Oxford Nanopore e Pacific Biosciences) que geram leituras longas.

Em 2006, a introdução do sequenciador Solexa da Illumina revolucionou o campo do sequenciamento genético por se tratar de um processo baseado na síntese nucleotídica por detecção de fluorescência (Liu et al., 2012). As plataformas da Illumina são as mais utilizadas e podem ser pequenas unidades de bancada de baixo rendimento e plataformas de alta produção destinadas à geração de uma grande quantidade de leituras, dedicados ao sequenciamento massivo de genomas grandes a nível de população. Na maioria das plataformas Illumina, como a MiSeq e HiSeq, cada um dos quatro nucleotídeos é marcado com um único fluoróforo específico, e utilizam quatro canais de leitura diferentes, e já as plataformas NextSeq e MiniSeq utilizam apenas dois (Goodwin et al., 2016). Em 2011, o MiSeq (Figura 2b), um sequenciador inovador de bancada compacto foi lançado pela Illumina e que pode sequenciar bibliotecas de maneira rápida produzindo centenas de gigabases de dados assim gerando genomas completos de vírus, bactéria, parasitas e até humanos (Ravi, Walton e Khosroheidari, 2018). Os sistemas NextSeq 1000/2000 bem como a NovaSeq 6000 (Figura 2c) são as plataformas de sequenciamento da Illumina mais atuais e são consideradas plataformas de produção pelo número expressivo de sequências geradas (20 bilhões no caso da Illumina). Ao mesmo tempo, o sequenciamento Illumina apresenta custo mais baixo em relação a maior produção sequências e custo reduzido dos reagentes.

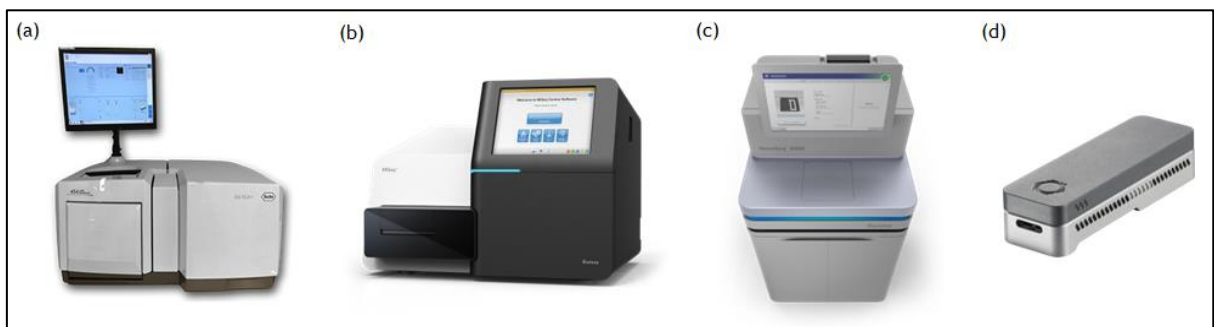


Figura 2. Imagens de sequenciadores: (a) Roche 454 (disponível em: <https://www.creative-biogene.com/blog/index.php/2017/02/02/the-next-generation-sequencing-platform-of-roche-454/>); (b) MiSeq Illumina (disponível em: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>); (c) NovaSeq 6000 Illumina (disponível em: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html>); (d) MinION Oxford Nanopore (disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/The-Oxford-Nanopore-MinION-a-thumb-drive-sequencer\\_fig6\\_327529567](https://www.researchgate.net/figure/The-Oxford-Nanopore-MinION-a-thumb-drive-sequencer_fig6_327529567)).

A terceira tecnologia desenvolvida é representada pela SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection - SOLiD) que foi comprada pela Applied Biosystems em 2006. Essa metodologia é fundamentada na hibridização e ligação de sequências de sondas marcadas,

ancoradas a uma fita de DNA (Landegren et al., 1988). No entanto, é a Ion Torrent que a tecnologia mais destacada da ThermoFisher Scientific. Esta tecnologia é baseada na captação de íons H<sup>+</sup> liberados durante a incorporação de cada nucleotídeo a fita molde de DNA durante a replicação (Goodwin et al., 2016). O Ion Torrent apresenta processamento de dados limitado, sendo mais aplicado em clínicas e pequenos laboratórios (Liu et al., 2012).

Em 2014, um sequenciador de 3<sup>a</sup> geração foi lançado, o MinION, da Oxford Nanopore Technologies (Figura 2d). Essa tecnologia consiste em detectar de forma ativa diretamente os nucleotídeos de uma fita simples de DNA, pois essa molécula atravessa um nanoporo constituído por proteínas, o qual é estabilizado em uma membrana eletricamente resistente (Branton et al., 2008). Uma voltagem é repassada essa membrana e, desta maneira, os sensores detectam mudanças na corrente iônica pelos nucleotídeos que ocupam o poro em tempo real à medida que a molécula de DNA se desloca, já que ela interrompe a voltagem através do canal (Goodwin et al., 2016). Uma exonuclease é utilizada para que o DNA se mantenha em fita simples e para a clivagem de nucleotídeos (Clarke et al., 2009).

Esse método de sequenciamento apresenta múltiplas vantagens em relação aos outros já existentes: custo relativamente baixo, e o mais importante tamanho muito menor em relação aos outros sequenciadores (cabe na palma da mão) e, portanto, é excelente ferramenta para o trabalho de campo; não há limite para o comprimento da fita de DNA a ser sequenciada, podendo gerar mais de 5 kbp em uma alta velocidade de 1 bp/10 ns (Timp et al., 2010); e, principalmente, trata-se de um dispositivo portátil que não requer equipamento sofisticado para detectar as sequências. Por fim, ele é acionado através de entradas USB de computadores, de forma que pode ser utilizado em qualquer lugar (Kono e Arakawa, 2019), inclusive em trabalhos de campo e laboratórios com infraestrutura escassa. Dessa maneira, esta tecnologia foi muito utilizada como vigilância epidemiológica genômica em diversas localidades no Brasil e no mundo. Em 2022, Giovanetti et al., utilizou o sequenciamento de nanoporos para identificar o surgimento de DENV-2 genótipo cosmopolita em um paciente do estado de Goiás, a fim de facilitar sua identificação e reduzir seu potencial epidêmico. Além disso, no mesmo ano, Fritsch et al., realizou um estudo retrospectivo de vigilância genômica da transmissão de CHIKV no estado de Minas Gerais utilizando a tecnologia da Oxford, mostrando a importância de combinar a análise epidemiológica e o sequenciamento portátil para identificar a transmissão viral. No entanto, em ambos os casos, o sequenciamento foi realizado com primers específicos que amplificam o genoma completo dos vírus estudados.

A maior limitação da metagenômica é o custo elevado dos procedimentos e da aparelhagem. O sequenciador NovaSeq 6000 é o equipamento mais recomendado para

metagenômica viral, entretanto possui um preço muito elevado. Portanto, as técnicas metagenômicas são restringidas apenas a grandes centros científicos. Além disso, os procedimentos de pré-preparo das amostras e a extração de ácidos nucleicos em relação a sequenciamento metagenômico não são bem estabelecidos. A identificação de genomas virais em amostras clínicas é um desafio devido a sua baixa presença em relação aos ácidos nucleicos do genoma do hospedeiro (Regnault et al., 2021) e a grande profundidade que precisa ser gerada pelo sequenciador. Sendo assim, é preciso obter ácidos nucleicos virais com alta pureza concentrados utilizando procedimentos analíticos de boa sensibilidade (Hall et al., 2014; Sauvage et al., 2016), aplicando técnicas de alta qualidade de depleção do material do hospedeiro, concentração e extração viral e amplificação do DNA. Além disso, não há um kit padrão para amplificação seletiva dos vírus, sendo outro desafio para identificação de agentes virais com baixa carga (Regnault et al., 2021).

Apesar dessas limitações, a metagenômica permite diversos avanços na compreensão da diversidade e ecologia viral, e pode ser aplicada para a área de hemoterapia, já que vírus emergentes desconhecidos podem impactar a transfusão sanguínea. Lau et al., em 2017, identificou sequências do astrovírus humano MLB2 em uma amostra de plasma de um doador de sangue através da metagenômica. Apesar de se tratar de uma viremia assintomática para ele, os astrovírus podem causar gastroenterite em pacientes imunossuprimidos, podendo atingir outros tecidos através da corrente sanguínea. Nos EUA e no Reino Unido, um novo flavivírus humano foi identificado em amostras de plasma de doadores de sangue e também de receptores transfundidos, sugerindo que esse vírus pode ser transmitido via transfusão sanguínea (Kapoor et al., 2015; Berg et al., 2015).

Portanto, a metagenômica viral tem potencial para revolucionar a segurança transfusional sendo importante para a identificação e caracterização de infecções emergentes desconhecidas. Além disso, se trata de uma tecnologia importante para a vigilância epidemiológica genômica de vírus emergentes com potencial epidêmico. Dessa forma, identificar metodologias de alta qualidade e de fácil acesso para tais objetivos é importante para superar as limitações da metagenômica.

## 2. JUSTIFICATIVA

As análises metagenômicas do viroma permitem a caracterização de agentes virais emergentes, bem como o monitoramento da disseminação epidêmica dos mesmos, a fim de conhecer sua circulação na população humana. São necessárias uma preparação adequada e uma resposta rápida capaz de prevenir novos surtos de doenças infecciosas desconhecidas (Mokili, Rohwer e Dutilh, 2012). No Brasil, atualmente, existem poucos estudos metagenômicos caracterizando vírus emergentes e que garantem vigilância sobre os mesmos. Ademais, estes estudos utilizam métodos laboratoriais muito diversificados que às vezes requerem procedimentos com alta complexidade, recursos específicos e, portanto, dificilmente aplicáveis em trabalhos de campo e áreas remotas, onde na maioria das vezes surgem os novos agentes virais. Um dos maiores desafios da metagenômica viral é o custo alto dos reagentes em conjunto com equipamentos de sequenciamento de custo elevado. Uma das técnicas mais vantajadas para utilização para fins metagenômicos é o sequenciamento Oxford Nanopore, que além de apresentar um custo mais baixo, pode ser facilmente manejado em trabalho de campo e, portanto, apresenta uma ótima ferramenta para realização de abordagens metagenômicos em lugares remotos. No entanto, por se tratar de uma tecnologia relativamente nova, a aplicação da mesma na área de metagenômica não é bem estabelecida. Os principais desafios incluem a falta de protocolos para o processamento e pré-processamento das amostras a serem estudadas e, principalmente, no que tange às técnicas de tratamento para remoção de ácidos nucleicos do hospedeiro, concentração dos vírus e amplificação do material genético. Outras questões importantes também precisam ser abordadas como o tempo da corrida e a análise bioinformática. No Brasil, existem estudos que aplicam e padronizam a tecnologia da Oxford Nanopore para metagenômica cuja otimização foi descrita no artigo Claro IM et al., 2021. No entanto, nesses procedimentos não são descritos procedimentos de concentração das partículas virais e a reação de PCR já diretamente gera os fragmentos que serão sequenciados. Portanto, o objetivo principal desse projeto é avaliar e padronizar as técnicas de concentração viral, amplificação do material genômico e a fragmentação em respeito de aumentar o rendimento de sequências virais geralmente representadas de baixos níveis utilizando metagenômica portátil e, assim, padronizar os procedimentos metagenômicos utilizando o sequenciamento Oxford Nanopore.

### **3. OBJETIVO PRINCIPAL**

Padronizar os pré-procedimentos da tecnologia MinION para o uso da metagenômica viral em hemoderivados.

### **4. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- 4.2.** Coletar e caracterizar molecularmente amostras de plasma de doadores de sangue infectados com HIV, HBV e HCV do Hemocentro de Ribeirão Preto e o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá;
- 4.3.** Padronizar as técnicas de pré-processamento (concentração e extração de ácidos nucleicos virais) e concentração de amostras de plasma para estudos metagenômicos;
- 4.4.** Aplicar a técnica de MinION para metagenômica de vírus;
- 4.5.** Avaliação dos dados bioinformáticos obtidos da plataforma MinION;
- 4.6.** Preparação de publicações científicas, participação em eventos científicos nacionais e internacionais bem como defesa de tese.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Fluxograma

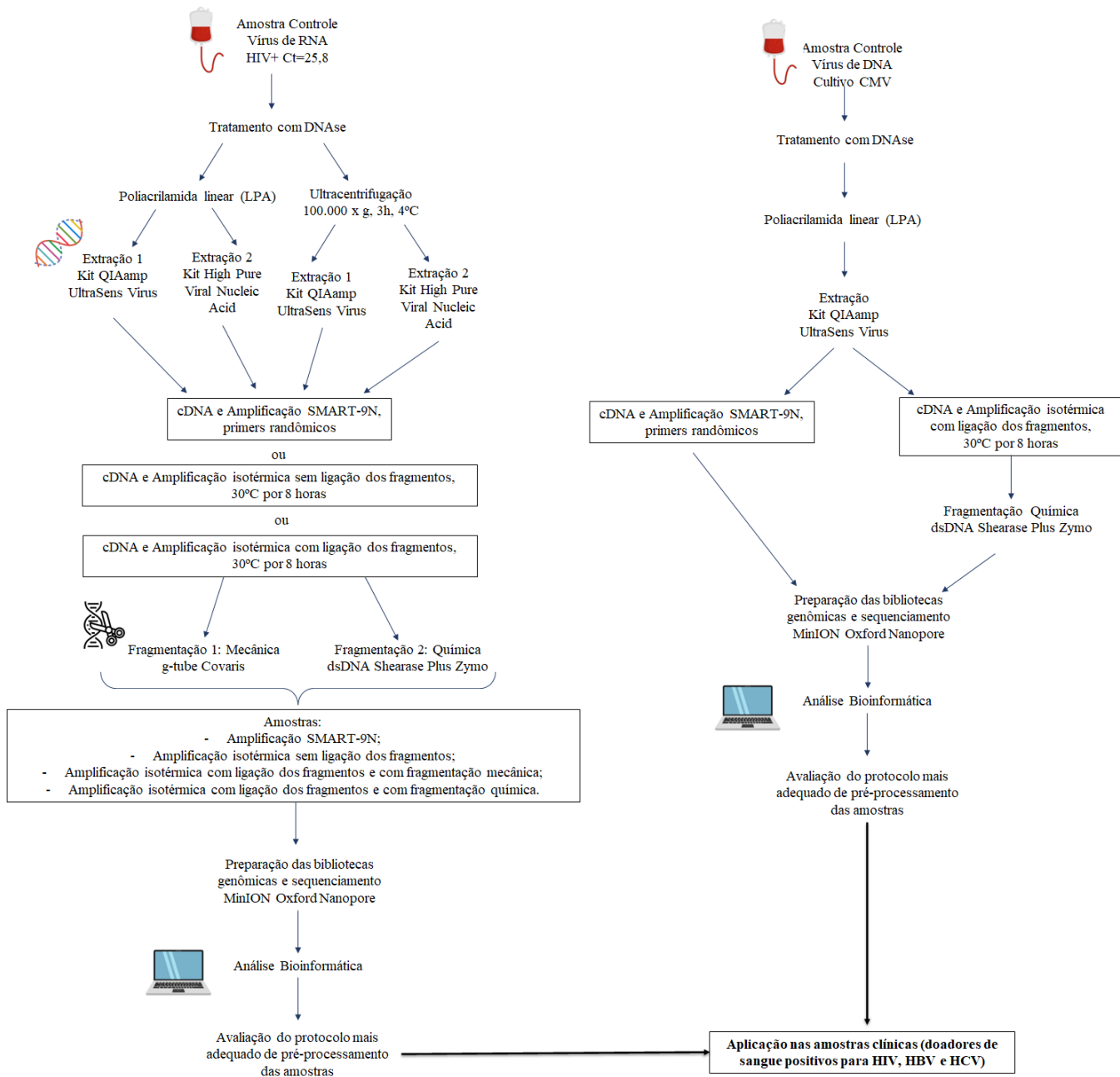


Figura 3. Fluxograma dos métodos do projeto apresentado. Primeiramente, uma amostra controle positiva para HIV (vírus de RNA) com Ct baixo 25,8, obtida de bolsa de sangue e uma amostra controle de cultivo de CMV (vírus de DNA) foram utilizadas para padronização dos processos de pré-preparo (concentração viral, extração dos ácidos nucleicos, métodos de fragmentação e amplificação) até a preparação das bibliotecas genômicas. Após a avaliação dos protocolos mais adequados para o sequenciamento MinION Oxford Nanopore, o método está sendo aplicado em amostras clínicas de doadores de sangue com infecções virais HIV, HBV e HCV.

## 5.2. Amostras Clínicas

### 5.2.1. Amostras controles

Para padronização do sequenciamento de última geração utilizando Oxford Nanopore, como controle positivo para vírus de RNA, nós utilizamos uma amostra de plasma obtida de doador de sangue positivo para HIV. Essa amostra é utilizada como controle positivo para as reações de diagnóstico molecular de HIV no Laboratório NAT do Hemocentro de Ribeirão Preto-FMRP-USP e a mesma apresenta *cycle threshold* (Ct) de 25,8. O Ct é a intersecção entre uma curva de amplificação e uma linha *threshold*, uma linha relativa, de uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real – *real time quantitative PCR* (do inglês, *polymerase chain reaction*), mostrando a concentração de um alvo em uma amostra (Heid et al., 1996). A amostra controle está armazenada em freezer -80°C na forma de alíquotas em razão de apresentar poucas variações no valor do Ct. Além disso, posteriormente, foi utilizada uma amostra de cultivo de citomegalovírus – CMV (do inglês, *Cytomegalovirus*), com alta concentração do vírus (Ct=20,0), como controle positivo para vírus de DNA. A amostra está armazenada em freezer -80°C.

### 5.2.2. Amostras clínicas submetidas a análise metagenômica

Durante o período de abril de 2020 a abril de 2023 foram utilizadas no total 14 amostras que foram obtidas de doadores de sangue positivas para uma das três infecções virais de triagem obrigatória molecular nos bancos de sangue. Destas amostras, 7 pertenciam a doadores positivos para HIV-1, 2 amostras positivas para DNA do HBV e 5 amostras positivas para HCV, todas na fase de janela imunológica. Ao mesmo tempo as características demográficas desses pacientes foram os seguintes: 71,43% (n=10) das amostras pertenciam a homens e 28,57% (n=4) das amostras pertenciam a mulheres. A idade média dos doadores de sangue foi de 43,71 anos, idade mínima 22 anos e idade máxima 61 anos.

Ao mesmo tempo foram utilizadas 19 amostras positivas para HIV, HBV e HCV do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá, Macapá, Estado do Amapá. Destas amostras, 6 foram positivas para HIV, 11 foram positivas HBV, 1 foi positiva para HCV e 1 apresentou concomitantemente infecção por HIV e HBV. Demograficamente, estas amostras pertenciam a 73,68% (n=14) homens e 26,32% (n=5) mulheres e a idade média dos doadores foi de 38,15 anos, idade mínima 21 anos e idade máxima 66 anos.

A distribuição da coleta de amostras no território nacional pode ser observada no mapa apresentado na figura 4. Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP (CAAE: 57499522.5.0000.5440).





Figura 4. Distribuição da coleta de amostras clínicas de doadores positivos para as infecções de triagem obrigatória nos bancos de sangue brasileiros.

### **5.3. Otimização do processo de sequenciamento de última geração com finalidade metagenômica utilizando Oxford Nanopore**

#### **5.3.1. Amostra controle vírus de RNA – HIV**

##### **a) Depleção do material do hospedeiro**

Passo inicial de pré-preparação das amostras para análise metagenômica inclui a digestão do material do hospedeiro e ácidos nucleicos livres. No nosso caso, para a digestão foi utilizada quantidade superior de DNase presente no kit (Turbo DNA-free Kit, ThermoFisher Scientific). A volume de 1 mL foi adicionado 3  $\mu$ l de DNase (2U/ $\mu$ l) e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Após a incubação a inativação da DNase foi realizada utilizando beads (DNase Inactivation Reagent) e centrifugação de 10.000 x g por 2 min. O sobrenadante tratado foi removido e submetido a concentração e extração de ácidos nucleicos.

##### **b) Concentração de ácidos nucleicos**

Para a concentração viral da amostra controle nós aplicamos duas estratégias: (i) concentração utilizando ultracentrifugação seguindo o protocolo de Cebria-Mendoza M. et al., 2021, com menores alterações (figura 5) e (ii) concentração utilizando agente químico: poli(acrilamida linear (abreviação LPA) (figura 6).

Para a concentração utilizando ultracentrifugação foi utilizado 1 mL da amostra de plasma positiva para HIV. As amostras foram submetidas a uma centrifugação inicial de 3000

x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi submetido a uma outra centrifugação de 10.000 x g durante 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi recuperado e adicionado em tubos e centrifugado a 100.000 x g durante 3 horas em rotor Type 90 Ti Fixed-Angle Titanium (Beckman Coulter) na ultracentrífuga Optima L-100K (Beckman Coulter) (figura 5). Após a ultracentrifugação, os pellets obtidos foram ressuspensos em 1 mL de PBS e submetidos a extração de ácidos nucleicos ou foram fixados para microscopia eletrônica de transmissão.

O agente GenElute LPA (Sigma) é agente químico utilizado para precipitação de ácidos nucleicos na presença de álcoois (etílico, isopropílico ou butílico). É um agente neutro que além de aumentar o rendimento de ácidos nucleicos não interfere na análise metagenômica. O coprecipitado de ácido nucleico e LPA é coletado através de centrifugação. A quantidade de LPA na amostra depende do volume utilizado e geralmente é 1 µl a cada 400 µl de amostra. No nosso caso, nos volumes de 1 mL nós colocamos 2,5 µl de LPA (25 µg/µl).



Figura 5. Ultracentrífuga Optima L-100K Beckman Coulter (Fonte: The Lab World Group, disponível em: <https://www.thelabworldgroup.com/product/beckman-coulter-optima-l-100k-ultracentrifuge/>)

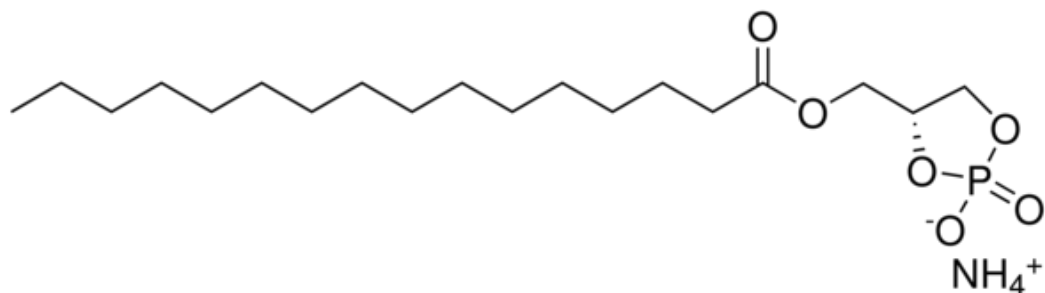


Figura 6. Estrutura química da poliacrilamida linear (GenElute LPA) usado para precipitação de ácidos nucleicos (Fonte: Sigma-Aldrich).

### **c) Avaliação da concentração de partículas virais utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As amostras de plasma foram filtradas utilizando filtros de 0,45  $\mu$ M para remoção de bactérias e materiais provenientes da lise celular. Elas passaram pelo protocolo de ultracentrifugação e após este procedimento, nós fizemos uma avaliação direta da presença de partículas virais utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Inicialmente os pellets foram lavados e fixados em formaldeído durante 4 h. Após uma centrifugação de 25.000 rpm durante 1 hora, o pellet foi diluído em 1X PBS com alta pureza e submetido a microscopia eletrônica. Para a microscopia eletrônica o pellet resultante diluído foi fixado por 30 minutos em grades de cobre reforçada com membrana de carbono utilizando tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) como contraste. A visualização das grades foi realizada em magnitude (aumento) de 300000 utilizando barra de medição 200nm. Todos os procedimentos foram realizados no microscópio de transmissão JEOL JEM-1230 (JEOL, Akishima-Tóquio, Japão) de alta capacidade de contraste 40-120 kV de transmissão. As fotos de microscopia eletrônica foram retiradas utilizando câmera profissional Hamamatsu ORCA-HR. Todos os procedimentos de microscopia eletrônica foram realizados no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

### **d) Estratégias para extração ácidos nucleicos**

Para a extração de ácidos nucleicos nós utilizamos duas estratégias diferentes (i) Kit QIAamp UltraSens Virus (Qiagen, Alemanha) e pelo (ii) Kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche).

O protocolo de extração utilizando o kit QIAamp UltraSens Virus utiliza 1 mL da amostra, que é inicialmente adicionada a um tampão de lise e 5,6  $\mu$ l de carrier RNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) em uma incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, para lise e precipitação das partículas virais. Em sequência, a amostra é centrifugada (1200 x g por 3 min) e o sobrenadante descartado. No pellet remanescente, a 20  $\mu$ l de proteinase K e um tampão de digestão são adicionados para lise das proteínas virais, que é feita a 40°C por 10 minutos. As condições basais são ajustadas pela adição de mais tampão e o lisado é aplicado a uma coluna QIAamp spin. Durante uma centrifugação (5000 x g por 1 minuto), o material genético se liga à membrana da coluna, enquanto que os contaminantes passam através dela. Os contaminantes remanescentes são removidos por centrifugação em dois passos de lavagem (6000 x g por 1

minuto; 20.000 x g por 3 minutos) e os ácidos nucleicos são eluídos em 60 µl de tampão de eluição.

O protocolo do kit High Pure Viral Nucleic Acid inclui a utilização de 1 mL de plasma da amostra, adicionada inicialmente ao binding buffer suplementado com 2,5 µl de LPA (25 µg/µl) e 250 µl de proteinase K em uma incubação de 70°C por 15 minutos. para lise das proteínas virais. Em sequência, a amostra é transferida para uma coluna (High Pure Extender Assembly) e centrifugada (4000 x g por 5 minutos) para separar os contaminantes dos ácidos nucleicos, já que eles se ligam à membrana da coluna. A coluna com o material genético, então, passa por uma lavagem com 500 µl de inibitor removal buffer com centrifugação de 8000 x g por 1 minuto, seguida por duas lavagens com 400 µl de tampão de lavagem com centrifugações de 8000 x g por 1 minuto. Finalmente, os ácidos nucleicos são eluídos em 50 µl do tampão de eluição pré-aquecido a 70°C.

#### **e) Transcrição Reversa**

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit SuperScript IV First Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific). O protocolo consistia das seguintes etapas: em primeiro lugar foi realizado o anelamento do primer randômico fosforilado (NNNN-PO33-) com o ácido nucleico a 65°C e por 5 min. Em seguida foi realizado o protocolo de transcrição reversa, o qual inclui 4 µl de 5X SSIV Buffer, 1 µl de 100mM de DTT, 1µl de Ribonuclease Inhibitor e 1 µl de SSIV Reverse Transcriptase (200 U/µl), em uma reação de 23°C por 10 minutos, seguido por 55°C por 10 minutos e, finalizando, 80°C por 10 minutos, para inativar a reação. A reação foi terminada com a utilização de RNase H por 37°C por 20 min, para eliminar RNAs contaminantes.

#### **f) Amplificação e ligação dos ácidos nucléicos**

Nós adotamos três estratégias para amplificação das ácidos nucleicos (i) amplificação total isotérmica acompanhada de ligação dos fragmentos (ii) amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos gerados e (iii) amplificação relacionada a geração de fragmentos uniformes seguindo o protocolo de Claro IM et al., 2021.

A reação de amplificação isotérmica utilizou o kit QuantiTect Whole Transcriptome Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Esse kit gera uma amplificação altamente uniforme de todos os transcritos presentes da reação de transcrição reversa e os mesmos são amplificados com representação igual das duas extremidades da 5' e a 3'. Outra característica desse kit é a possibilidade de amplificação de quantidades mínimas de cDNA presentes na reação atingindo

concentrações de até 40 µg. O kit utiliza a tecnologia de amplificação denominada como REPLI-g que realiza deslocamento de fitas de DNA que resulta em amplificação imparcial. Os procedimentos realizados estão apresentados abaixo:

(i) Amplificação total isotérmica acompanhada de ligação dos fragmentos

Nesta estratégia de amplificação, nós realizamos a ligação dos fragmentos de cDNA gerados pela transcrição reversa através de um mix de ligação de alta eficiência contendo 1 µl de cada uma das enzimas ligases 1 e 2, 2 µl do reagente de ligação e 6 µl do tampão de ligação, em uma incubação de 22°C por 2 horas. Após formado o longo fragmento, um mix de 1 µl da enzima REPLI-g Midi DNA Polymerase com 29 µl do REPLI-g Midi Reaction Buffer foi adicionado a amostra, para a amplificação deste longo fragmento. A amplificação ocorre de maneira isotérmica, a 30°C por 8 horas.

(ii) Amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos gerados

Nesse tipo de amplificação, o protocolo é o mesmo da amplificação isotérmica sem a incorporação de passo de ligação. 1 µl da enzima REPLI-g Midi DNA Polimerase e 29 µl do tampão de reação REPLI-g foram adicionados a 10 µl do cDNA produzido na transcrição reversa, e foram incubados a 30°C durante 8 horas. Nesse método, decidimos testar a influência da ligação realizando apenas a amplificação isotérmica, sem a ação das ligases.

(iii) Amplificação relacionada a geração de fragmentos uniformes seguindo o protocolo de Morales e Quick, 2019.

Após a extração dos ácidos nucleicos, as amostras foram submetidas a transcrição reversa e amplificação utilizando os primers evidenciados na tabela 1, o kit SuperScript IV First Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific) para transcrição reversa e o sistema Q5 High-Fidelity para amplificação.

Tabela 1. Oligos utilizados no protocolo de amplificação SMART-9n (Morales e Quick, 2019).

| <b>Primer</b> | <b>Sequência de nucleotídeos</b>           |
|---------------|--|
| RLB TSO       | GCTAATCATTGCTTTTTTCGTGCGCCGCTTCAACATrGrGrG |
| RLB RT 9N     | TTTTTCGTGCGCCGCTTCAACNNNNNNNNN             |
| RLB PCR       | TTTTTCGTGCGCCGCTTCA                        |

Na transcrição reversa, primeiramente, combinamos 10  $\mu$ l do material extraído com 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) e 1  $\mu$ l do primer RLB RT 9N (2  $\mu$ M). Esse mix foi incubado a 65°C por 5 minutos para anelamento do primer. Em seguida, foram adicionados a amostra 4  $\mu$ l de SSIV Buffer (5X), 1  $\mu$ l de DTT (100 mM), 1  $\mu$ l de RNase OUT, 1  $\mu$ l de SSIV RTase (200 U/ $\mu$ l) e 1  $\mu$ l do primer RLB TSO (2 uM), formando uma reação de 20 $\mu$ l. A transcrição reversa ocorreu a 42°C por 1 hora e 30 minutos, e foi inativada a 70°C por 10 minutos. 6  $\mu$ l do cDNA resultante foi então amplificado em uma reação de 50  $\mu$ l, contendo 10  $\mu$ l de Q5 Reaction Buffer (5X), 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 0,5  $\mu$ l de Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ l), 2,5  $\mu$ l do primer RLB PCR (2  $\mu$ M) e 30  $\mu$ l de nuclease-free water para completar o volume total. A reação aconteceu em uma ativação inicial a 95 °C por 45 segundos, seguida por 26 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 56°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

### **g) Estratégias para preparação de bibliotecas genômicas**

#### **(i) Fragmentação**

Uma das etapas primordiais para o sucesso do sequenciamento de última geração e a metagenômica é a obtenção de fragmentos de tamanho adequado para serem sequenciados e posteriormente analisados através da análise bioinformática. Para geração dos fragmentos nós adotamos as seguintes estratégias: fragmentação mecânica; fragmentação química utilizando endonucleases; geração de fragmentos através de reação de amplificação; e reação de amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos. Os procedimentos acompanhando cada reação estão sendo descritos abaixo:

#### **Fragmentação mecânica**

A fragmentação mecânica foi realizada utilizando a estratégia recomendada pela Oxford Nanopore de g-tubo (g-tube) pelo Covaris. Nesse método é utilizado um tubo que realiza

fragmentação mecânica na base de hidrodinâmica que em respeito a velocidade da centrífuga gera fragmentos de 6 a 20 kb. O protocolo que implementamos utilizou 49 µl de amostra contendo 1 µg de produto de amplificação inicial, que foi centrifugado a 6000 RPM por 1 minuto duas vezes na centrífuga Eppendorf 5418R, com a suposta geração de fragmentos de 8 kb.

### **Fragmentação química**

Esse método consiste na fragmentação através da endonuclease dsDNA Shearase Plus Zymo. A digestão com a dsDNA Shearase™ Plus é a metodologia mais simples para fragmentação de DNA e não precisa de custosas técnicas como a fragmentação mecânica acima descrita. Esta técnica conta com a ação de endonuclease que corta as ligações fosfodiéster e rende fragmentos com extremidades 5'-fosfato e 3' hidroxila. Esta endonuclease apresenta preferências por DNA de fita dupla e gera fragmentos de tamanho igual em um único passo. Ainda, esta enzima não introduz viés na preparação de bibliotecas genômicas e, portanto, é uma excelente ferramenta para utilização na metagenômica. No protocolo de fragmentação química foram utilizados 15 µl do DNA amplificado para uma reação de volume total de 50 µl, contendo 10 µl de dsDNA Shearase Plus Reaction Buffer (5X), 2,5 µl da enzima dsDNA Shearase Plus (100 ng/µl) e 22,5 µl de nuclease-free water para completar o volume final. A reação foi incubada a 42°C por 20 minutos e, para parar a reação, a incubação foi de 65°C por 10 minutos.

### **Geração de fragmentos uniformes através de amplificação utilizando o protocolo de Morales e Quick, 2019**

Nesse protocolo nós utilizamos o protocolo estabelecido por Morales e Quick, 2019. Nós utilizamos os primers indicados na tabela 1 e o protocolo está descrito no item acima “(iii) Amplificação relacionada a geração de fragmentos uniformes seguindo o protocolo de Morales e Quick, 2019”, já que os fragmentos são gerados junto a transcrição reversa e amplificação.

### **Amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos**

Nesse tipo de amplificação o protocolo é o mesmo da amplificação isotérmica sem a incorporação de passo de ligação. 1 µl da enzima REPLI-g Midi DNA Polimerase e 29 µl do tampão de reação REPLI-g foram adicionados a 10 µl do cDNA produzido na transcrição reversa em uma reação a 30°C durante 8 horas. Nesse método, decidimos

testar a influência da ligação realizando apenas a amplificação isotérmica, sem a ação das ligases.

**(ii) Preparação das bibliotecas genômicas**

O protocolo utilizado implementou o sistema de barcoding EXP-NBD104, que possui os barcodes NB01 a NB12, oferecido pelo MinION, na flow-cell R.9.4.1. Primeiramente, os produtos amplificados foram purificados utilizando AMPure XP beads (Beckman Dickinson). Em seguida, foi realizada a reparação das extremidades utilizando 20 µl do amplicons purificados adicionados a 1,2 µl da enzima Ultra II End Prep Enzyme Mix (NewEngland BioLabs) e 2,8 µl do tampão de reação Ultra II End Prep Reaction Buffer (NewEngland BioLabs), em uma incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e a 65°C por 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram purificadas utilizando 1X AMPure XP beads e o material genético final foi eluído em 11 µl de água nuclease-free.

O próximo passo de preparação das bibliotecas foi a ligação dos barcodes às extremidades do DNA. Nesse passo, foram utilizados o kit de barcodes EXP-NBD104 (NB01 a NB12) e o mix Blunt/TA Ligase Master Mix (NewEngland BioLabs), que contém a enzima necessária para que ocorra a ligação. 10 µl do material genético eluído de cada amostra foi adicionado a 12,5 µl da Blunt/TA Ligase e 2,5 µl do barcode específico para cada amostra. A ligação ocorreu em uma incubação de 15 minutos a temperatura ambiente e a enzima foi desnaturada a 65°C por 30 minutos. Após a ligação dos barcodes, as amostras foram combinadas em um único tubo (biblioteca das amostras) e a biblioteca foi purificada utilizando 1X AMPure XP beads. O DNA final foi eluído em 46 µl de água nuclease-free. Além disso, 1 µl da biblioteca foi quantificado com o kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay no equipamento Qubit 3.0 Fluorometer para garantir que o material genético não foi perdido durante as purificações.

Em seguida, os adaptadores foram ligados às extremidades do DNA, utilizando o kit SQK-LSK109. 45 µl da biblioteca foi adicionado a 5 µl de Adapter Mix II (AMII) e 50 µl do mix Blunt/TA Ligase Master Mix, que contém a enzima necessária para a ligação. Os adaptadores foram ligados em uma reação a temperatura ambiente por 30 minutos. 100 µl das beads magnéticas foram adicionadas a reação para purificação da biblioteca e, em sequência, foram feitas duas lavagens das beads com 250 µl Short Fragment Buffer (SFB). A biblioteca final pura foi eluída em 12 µl de Elution Buffer (EB) e 1 µl dela foi utilizado para quantificação utilizando o kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay no equipamento Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific).



### **h) Sequenciamento de última geração**

As bibliotecas foram diluídas para 30 ng em 12 µl com Elution Buffer (EB) e adicionadas a 37,5 µl de Sequencing Buffer (SQB) e 25,5 µl de Loading Beads (LB), reagentes necessários para a passagem da biblioteca pelos poros da flowcell. Os sequenciamentos de última geração foram realizados em flowcell R9.4.1, utilizando o kit Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002). 30 µl de Flush Tether (FLT) foram adicionados diretamente ao Flush Buffer (FLB), formando o priming mix.

Para a corrida, 800 µl do priming mix foi adicionado a loading port da flowcell. Após 5 minutos, mais 200 µl do priming mix foi colocado na flowcell e, em sequência, o volume total da biblioteca com SQB e LB foram colocados na porta SportON port e a flowcell foi colocada para corrida. Para realizar o sequenciamento, foi utilizado o software MinKNOW da Oxford Nanopore. O sequenciamento metagenômico foi realizado em 48 horas para aumentar significativamente a profundidade do sequenciamento. Após o final da corrida, o kit de digestão e lavagem Flow Cell Wash Kit (EXP-WSH004), que contém DNase, foi adicionado a flow cell para aproveitá-la para reuso.

### **i) Análise Bioinformática**

Os arquivos brutos do sequenciamento foram processados utilizando Guppy e a demultiplexação dos barcodes foi executada utilizando o comando *guppy\_basecaller*. Depois desses procedimentos, a análise foi feita seguindo uma pipeline de metagenômica estabelecida no nosso grupo contendo procedimentos de mapeamento até a taxonomia viral com o Kraken2.

Após o *basecalling* e a demultiplexação, os arquivos foram alinhados com o genoma de referência utilizando o software *Minimap2* (Li, 2018) versão 2.17-r974-dirty, ideal para o alinhamento de longas sequências de DNA e/ou RNA, portanto, para os *reads* obtidos. Sua documentação pode ser encontrada em: <<https://github.com/lh3/minimap2>>. O genoma de referência é o de *Homo sapiens* (Humano), cujo número de acesso é GRCh38.p14, disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001405.40](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40). A linha de comando utilizada foi: *minimap2 -ax map-ont -t 8 human\_reference.fasta reads.fasta > aln.sam*.

Após a conversão do formato de arquivo .sam para .fastq e a seleção das leituras não-mapeadas com o auxílio do *Samtools* (Daneck et al., 2021) versão 1.12, foi possível utilizar o *Kraken2* (Wood et al, 2019) com seu banco de dados *default* RefSeq NCBI. A linha de comando para o *Kraken2* foi *kraken2 -db /path-to-database/ -t 12 unmapped.fastq.gz -report*

*unmapped.tsv*. Finalmente, os contigs montados foram submetidos a blast no programa BLASTN do NCBI.

### **5.3.2. Amostra controle vírus de DNA – CMV**

A amostra controle de cultivo de CMV para vírus de DNA passou pelos processos de depleção do material do hospedeiro (item 5.3.1.a), concentração das partículas virais por poliacrilamida linear LPA (descrito no item 5.3.1.b), extração dos ácidos nucleicos com o kit QIAamp UltraSens Viral (Qiagen, Alemanha), descrito no item 5.3.1.d). Para a geração dos fragmentos, foram utilizados dois protocolos distintos descritos no item 5.3.1.f, a fim de comparação: (i) amplificação relacionada a geração de fragmentos uniformes seguindo o protocolo de Morales e Quick, 2019 e (ii) amplificação total isotérmica acompanhada de ligação dos fragmentos, seguida de fragmentação química por endonucleases, protocolo descrito no item 5.3.1.g.(i). Em sequência, os mesmos métodos de preparação das bibliotecas genômicas, aplicação no sequenciador de última geração e análise bioinformática, aplicados a amostra controle de vírus de RNA – HIV, foram reaplicados na amostra controle de vírus de DNA – CMV (itens 5.3.1.g(ii), 5.3.1.h e 5.3.1.i).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Concentração de partículas virais: avaliação de concentração através de microscopia eletrônica

Na técnica de microscopia eletrônica de transmissão, nós avaliamos se a amostra controle de HIV que passou por ultracentrifugação foi concentrada adequadamente. Foi possível observar partículas virais semelhantes ao HIV na amostra concentrada (Figura 7), mostrando partícula viral com tamanho esperado (~80 nm). Além disso, podemos observar uma abundância de fagos muito densos concentrados nas amostras, pois são partículas virais de tamanho menor ao esperado (<80 nm) (Figura 8). Estes resultados nos demonstram que a tecnologia de concentração por ultracentrifugação é uma excelente ferramenta de concentração viral.

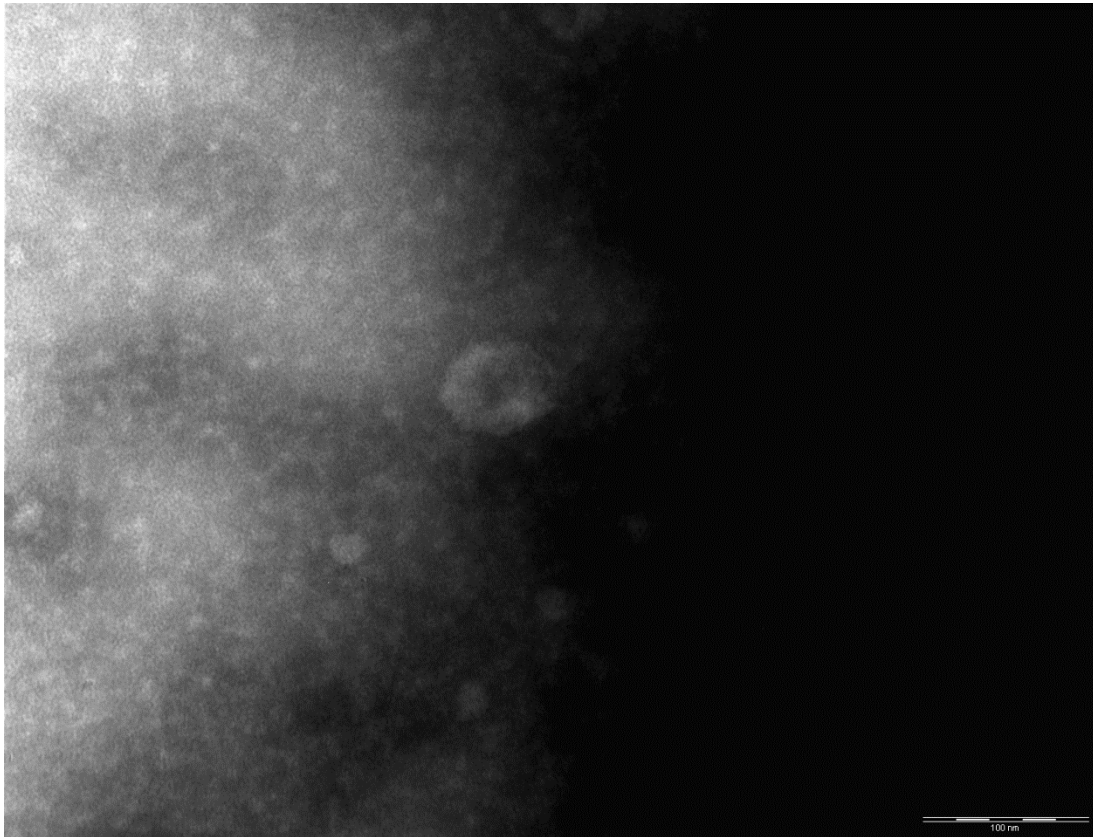


Figura 7. Imagem da microscopia eletrônica da amostra positiva para HIV concentrada em ultracentrifugação. Na mesma, é possível observar partícula viral de HIV em seu tamanho esperado (~80 nm) e nucleocápsídeo mais denso. Barra de microscopia de transmissão, 100 nm.

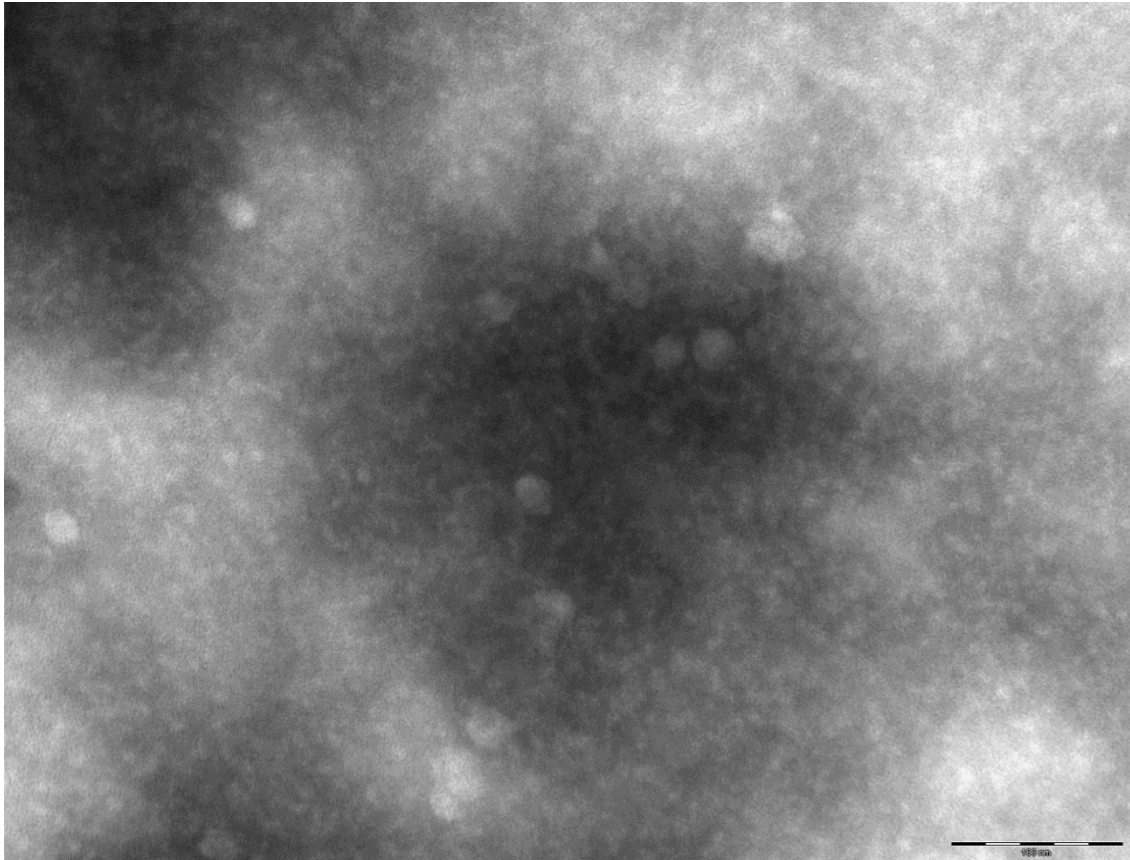


Figura 8. Imagem da microscopia eletrônica da amostra positiva para HIV concentrada em ultracentrifugação. Na mesma, é possível observar diversas partículas virais pequenas, apontando a presença de múltiplos fagos na amostra concentrada. Em alguns casos é possível observar as caudas quebradas dos fagos. Barra de microscopia de transmissão, 100 nm.

## **6.2. Testes iniciais de aplicação da metagenômica no sequenciamento nanopore MinION**

No primeiro instante, nós aplicamos extração utilizando os kits QIAamp UltraSens Virus (QIAGEN) e High Pure Viral Nucleic Acid (Roche) nas amostras controle de HIV concentradas através de ultracentrifugação e seguimos com os passos de transcrição reversa e amplificação isotérmica com ligação dos fragmentos e prosseguir com purificação das bibliotecas.

No entanto, durante a purificação para o preparo das bibliotecas genômicas no momento de aplicação das beads magnéticas, as mesmas precipitaram na forma de grumos (Figura 9). Nós explicamos esse ocorrido com o tamanho elevado as fitas de DNA amplificadas através de amplificação térmica e principalmente a sua ligação em fitas de longo comprimento. Isso deve-se a nossa intenção de adaptar a reação isotérmica ao sequenciamento de nanoporos que utiliza fragmentos adquiridos durante a amplificação e não fragmentos que são adicionalmente

cortados em processo de tagmentação que é específico do sequenciamento Illumina onde a amplificação isotérmica é amplamente utilizada.

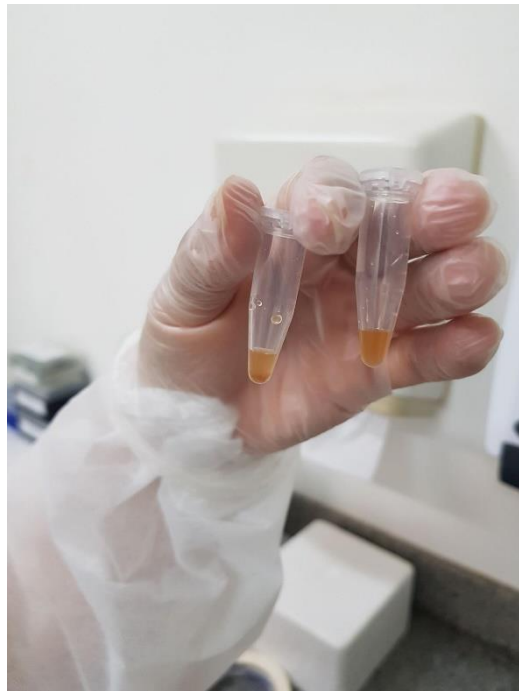


Figura 9. Foto de acervo pessoal mostrando os grumos de beads formados durante a purificação do DNA (lado esquerdo) em comparação com o controle negativo, sem grumos (lado direito).

Apesar deste problema, decidimos continuar com o preparo das bibliotecas e o sequenciamento em si. As bibliotecas foram preparadas normalmente depois da retirada dos grumos. Os resultados do sequenciamento mostraram baixa qualidade: presença de leitura de fragmentos muito longos (alguns acima de 80 kb), e pouca quantidade de dados gerados (<1 Gb) e adequados para análise. No total foram geradas ~ 140 mil leituras que também mostraram insuficiente para uma análise robusta.

Para a análise bioinformática preliminar, utilizamos procedimentos de basecalling e demultiplexação utilizando o software Guppy para avaliar a abundância viral. A nossa análise bioinformática utilizando o classificador taxonômico Kraken2 demonstrou a presença. Nós conseguimos identificar apenas alguns fagos devido a perda excessiva de materiais genéticos durante o processo de preparo de bibliotecas. Dentre os fagos mais proeminentes foram *Echerichia virus ECH*, *Trichoderma virens FT-333*, *Klebsiella virus 2019KP1* e *Escherichia virus LS3*. Isso nos demonstra que, apesar da baixa qualidade do sequenciamento, a concentração de material genético foi realizada de maneira adequada, uma vez que fagos foram detectados, embora não houvesse sequências de HIV.

Com a finalidade de otimizar o sequenciamento e aplicar o melhor método para avaliar a abundância de vírus em amostras provenientes de doadores positivos para NAT de HIV, HBV e HCV, nós voltamos a nossa atenção ao processo de fragmentação dos fragmentos gerados. Para esta finalidade nós aplicamos duas fragmentações diferentes, i.e., química e mecânica, bem como a geração de fragmentos de PCR utilizando os primers de Morales e Quick, 2019. Ao mesmo tempo, nessa estratégia nós aplicamos dois métodos diferentes de extração (kit da QIAGEN e Roche) a cada processo de fragmentação e todos esses procedimentos foram aplicados dependendo da concentração viral (ultracentrífuga ou precipitador químico – poliacrilamida linear). Depois cada um dos procedimentos foi avaliado para a contagem das leituras virais (avaliação quantitativa de presença de HIV), abundância viral total e presença de outros vírus que podem ser identificados através da análise metagenômica. Nas tabelas 2 a 5 está demonstrada a quantidade de leituras virais dependendo do método de concentração, extração e amplificação que foram obtidos os seguintes resultados.

Em sequência, nós avaliamos a abundância viral entre os diferentes métodos de fragmentação (Figuras 10 a 14). É possível observar que na fragmentação química por endonucleases, não houve uma alta abundância viral juntamente com o número baixo de leituras de HIV, foram as amostras que mostraram menos leituras virais (Figura 10, Tabela 2). Em comparação, na fragmentação mecânica por g-tube Covaris, é possível visualizar uma maior abundância viral, com a presença de mastadenovírus, diversos torque teno vírus e muitas leituras de HIV (Figura 11, Tabela 3). As amostras que passaram por amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos apresentaram alto número de leituras virais e alta abundancia, mas não apresentaram leituras de HIV (Figura 12, Tabela 4). Por fim, as amostras que passaram pelo método de amplificação SMART-9N foram as amostras com maior número de leituras virais de HIV e aquelas que apresentaram maior abundancia viral (Figura 13, Tabela 5). Isso se deve ao fato de serem primers randômicos, mas específicos para a amplificação de genomas virais, facilitando sua identificação por meio do sequenciamento.

Tabela 2. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de fragmentação química por endonucleases.

| Endonuclease | Número de Leituras Virais | Porcentagem de Leituras Virais | Leituras de HIV |
|--------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|
| LPA/QIAGEN   | 5                         | 0,69%                          | 3               |
| LPA/ROCHE    | 56                        | 0.22%                          | 0               |
| ULTRA/QIAGEN | 49                        | 0,8%                           | 0               |
| ULTRA/ROCHE  | 30                        | 0,05%                          | 0               |

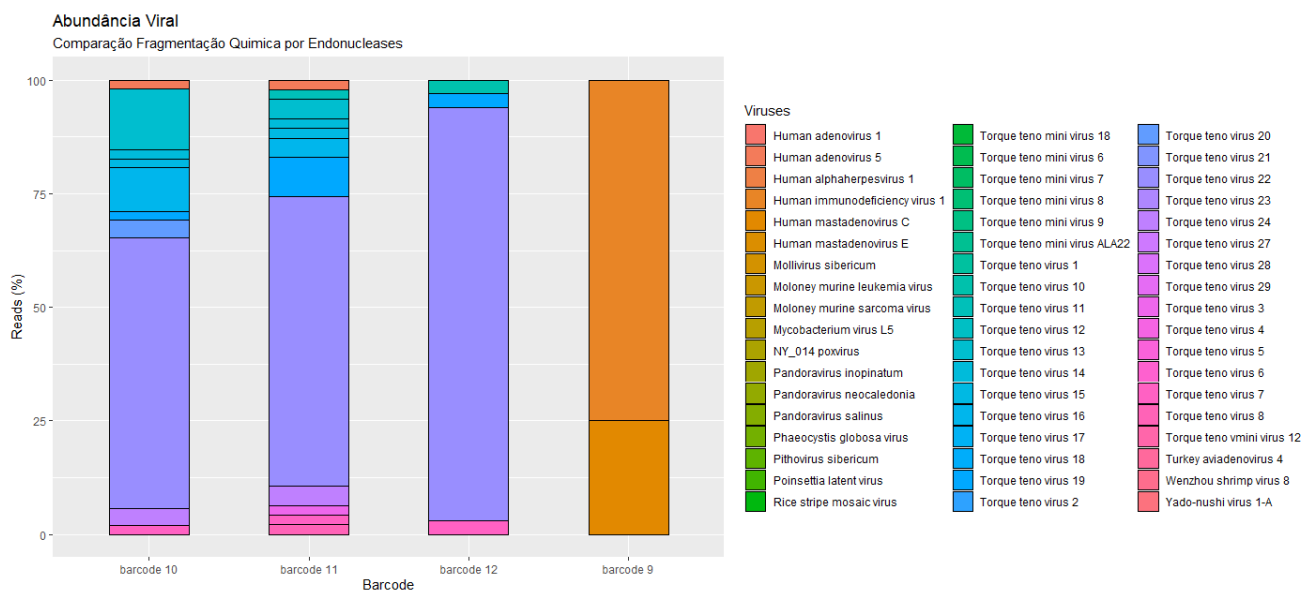


Figura 10. Abundância viral pela fragmentação química por endonucleases.

Tabela 3. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de fragmentação mecânica por g-tube Covaris.

| Covaris      | Número de Leituras Virais | Porcentagem de Leituras Virais | Leituras de HIV |
|--------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|
| LPA/QIAGEN   | 16                        | 0,55%                          | 3               |
| LPA/ROCHE    | 6                         | 0,18%                          | 3               |
| ULTRA/QIAGEN | 12                        | 0.2%                           | 3               |
| ULTRA/ROCHE  | 5                         | 0,15%                          | 1               |

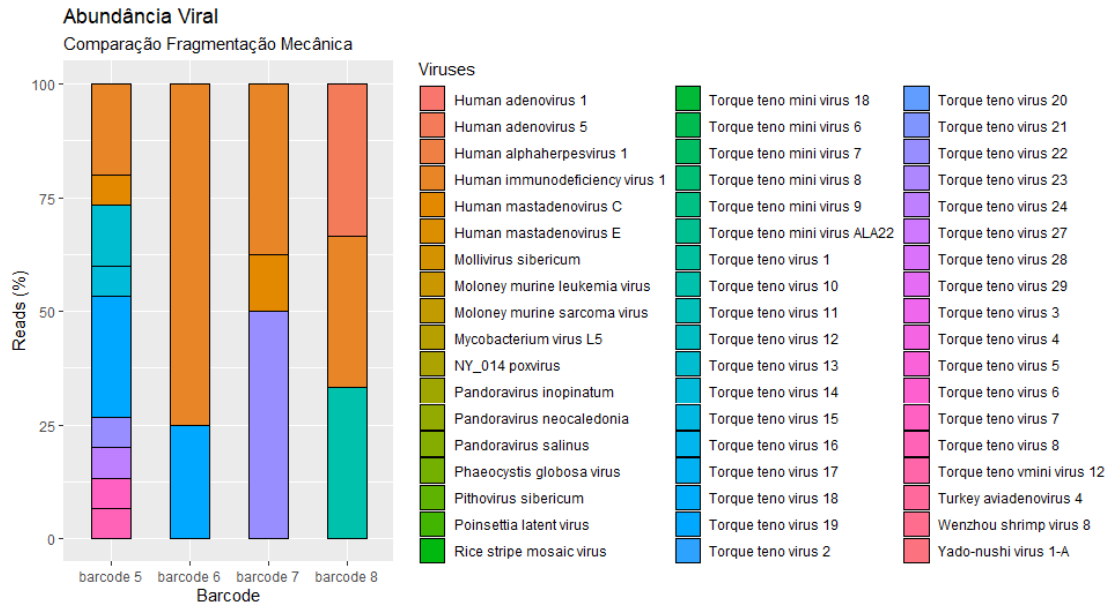


Figura 11. Abundância viral pela fragmentação mecânica por g-tube Covaris.

Tabela 4. Quantidade de leituras virais nas amostras do método de amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos.

| Amplificação isotérmica sem ligação dos fragmentos | Número de Leituras Virais | Porcentagem de Leituras Virais | Leituras de HIV |
|--|---------------------------|--------------------------------|-----------------|
| LPA/QIAGEN   | 50                        | 0,18%                          | 0               |
| LPA/ROCHE  | 4718                      | 65,25%                         | 0               |
| ULTRA/QIAGEN                                       | 4534                      | 83,22%                         | 0               |
| ULTRA/ROCHE  | 2768                      | 34,75%                         | 2               |



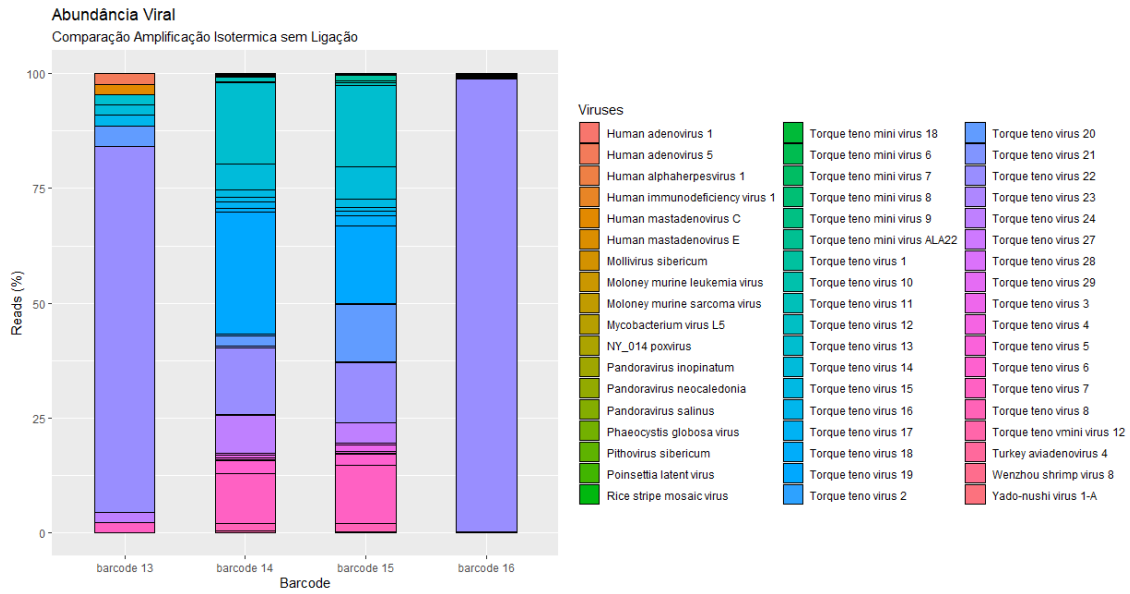


Figura 12. Abundância viral pelo método de amplificação isotérmica sem ligação.

Tabela 5. Quantidade de leituras virais nas amostras diferentemente concentradas e extraídas do método SMART-9N.

| SMART-9N     | Número de Leituras Virais | Porcentagem de Leituras Virais | Leituras de HIV |
|--------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|
| LPA/QIAGEN   | 1009                      | 0,54%                          | 951             |
| LPA/ROCHE    | 35                        | 0,07%                          | 13              |
| ULTRA/QIAGEN | 1146                      | 0,73%                          | 1098            |
| ULTRA/ROCHE  | 1914                      | 0,44%                          | 142             |

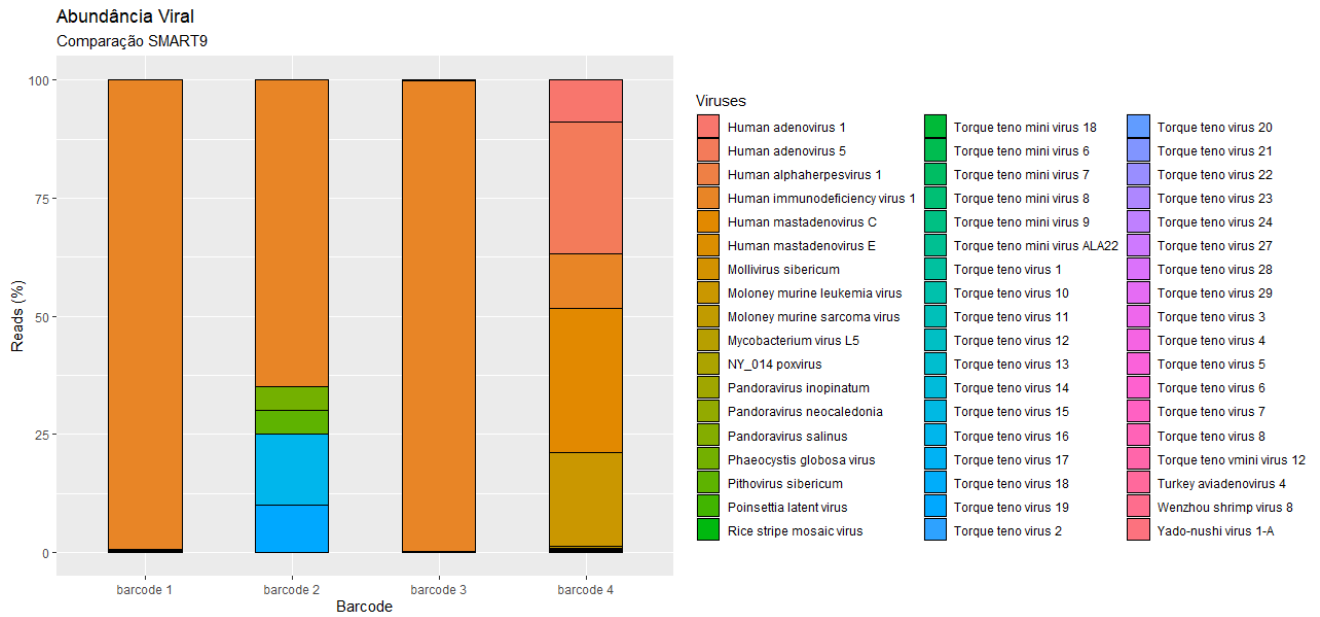


Figura 13. Abundância viral pelo método de amplificação SMART-9n.

Em suma, a abundância viral de todas as amostras está representada na figura 14. Nós propusemos a aplicação da seguinte metodologia para metagenômica no sequenciador MinION Oxford Nanopore: concentração por ultracentrifugação, extração pelo kit Roche e amplificação de fragmentos pelo método SMART-9N.

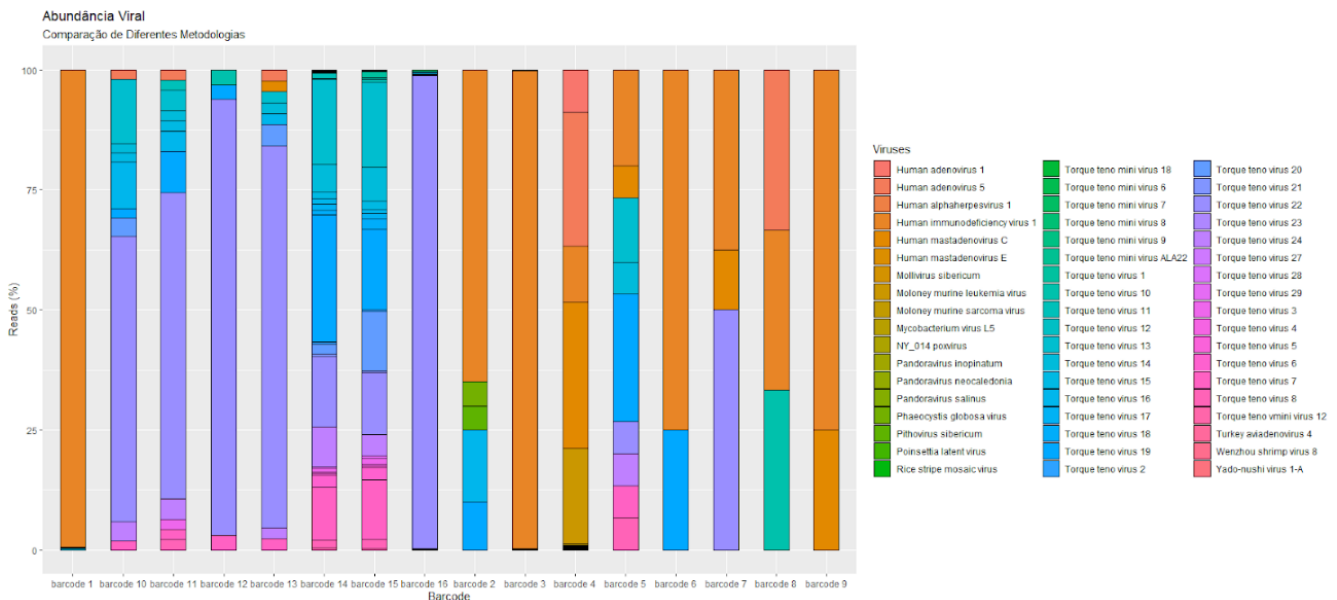


Figura 14. Abundância viral comparando todos os métodos de fragmentação.

Além dos testes de padronização com a amostra controle positiva para HIV (vírus de RNA), nós utilizamos uma amostra de cultivo de CMV para testar os diferentes métodos para um vírus de DNA. Dados os resultados da padronização, nós decidimos utilizar nesta amostra

a concentração por LPA, extração pelo kit da QIAGEN e testamos dois diferentes métodos de geração de fragmentos: à amplificação por primers randômicos, SMART-9N, e a fragmentação química por endonucleases, a fim de visualizar se o método escolhido para vírus de RNA também poderia ser aplicado em vírus de DNA. Nós escolhemos a concentração por LPA e a extração pelo kit da QIAGEN pensando em facilitar a preparação das amostras, principalmente em trabalhos de campo. No caso de vírus de RNA, excluindo a ultracentrifugação, a combinação de concentração por LPA, extração pelo kit da QIAGEN e amplificação SMART-9N foi a que trouxe maior quantidade de leituras virais e leituras de HIV.

Para as amostras de cultivo de CMV, obtivemos um maior número de leituras virais e de leituras de CMV na amostra cuja amplificação foi feita através do método SMART-9N em relação a fragmentação química por endonucleases (Tabela 6, Figuras 15 e 16). Com isso, identificamos que a recuperação de ácidos nucleicos pelo método SMART-9N é feita de forma mais adequada tanto para vírus de RNA quanto para vírus de RNA.

Tabela 6. Quantidade de leituras virais nas amostras de cultivo de CMV amplificadas pelo método SMART-9N e nas amostras com DNA fragmentado por endonucleases.

| Amostra Controle<br>Vírus DNA - CMV | Número de Leituras<br>Virais | Porcentagem de Leituras<br>Virais | Leituras de<br>CMV |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| LPA/QIAGEN/SMART-9N                 | 2397                         | 2,98%                             | 2382               |
| LPA/QIAGEN/Endonuclease             | 98                           | 0.11%                             | 74                 |

Abundância de *Cytomegalovirus* nas Amostras Controle  
Amplificação SMART-9N

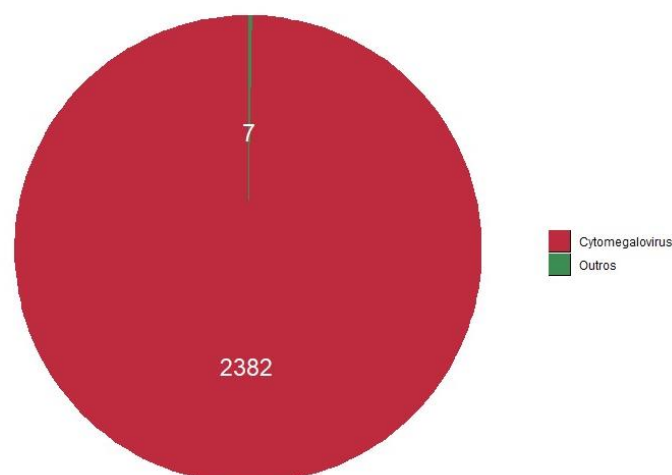


Figura 15. Abundância viral na amostra controle de CMV com geração de fragmentos pelo método SMART-9N.

Abundância de *Cytomegalovirus* nas Amostras Controle  
Fragmentação Química por **Endonucleases**

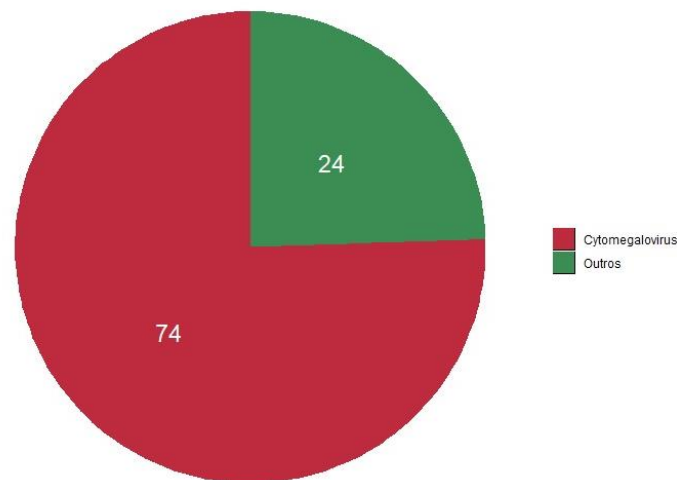


Figura 16. Abundância viral na amostra controle de cultivo de CMV com fragmentação do DNA por endonucleases.

Após a análise dos resultados envolvendo os diferentes métodos utilizados para as amostras controle tanto de vírus de RNA quanto vírus de DNA, nós observamos que para garantir bons resultados, nas amostras clínicas, devemos aplicar os seguintes métodos para as amostras clínicas: tratamento com DNase, concentração por LPA, extração dos ácidos nucleicos através do kit da QIAGEN e geração de fragmentos pelo método SMART-9N, como mostra o fluxograma na figura 17.

### 6.3. Amostras clínicas

Nós aplicamos o fluxograma de metodologia mostrado na figura 17 nas amostras clínicas de doadores de sangue com diagnóstico NAT positivo para HIV, HBV e HCV do Hemocentro de Ribeirão Preto. As amostras clínicas coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá não foram utilizadas para análise devido aos altos valores de Ct para os vírus selecionados, o que não garantiu a qualidade necessária para aplica-las no sequenciador. Foi possível observar que em todas as amostras foram identificados os vírus alvos com exceção de duas amostras positivas para HCV e uma para HIV. Nas amostras positivas para HBV, foram identificados também vírus como vírus da hepatite G – GBVC (do inglês, *GB virus C/ Hepatitis G virus*), HIV, HCV, sendo que os dois últimos podem indicar contaminação das amostras ou, ainda, classificação bioinformática errônea (Figura 18). Além disso, nas amostras positivas para HCV, também foram encontradas leituras virais de GBVC, HIV e torque teno vírus 5 (TTV-5) (Figura 19). Já nas amostras positivas

para HIV, além de leituras virais deste vírus, também obtivemos leituras de GBVC, TTV-5 e vírus betaherpes humano 5, também conhecido como citomegalovírus humano (HCMV, do inglês *Human cytomegalovirus*) (Figura 20). É importante salientar que o barcode 15 indicado na figura 20 e que teve apenas leituras virais de GBVC é uma amostra controle negativo, mostrando que não houve contaminação nas amostras clínicas testadas.

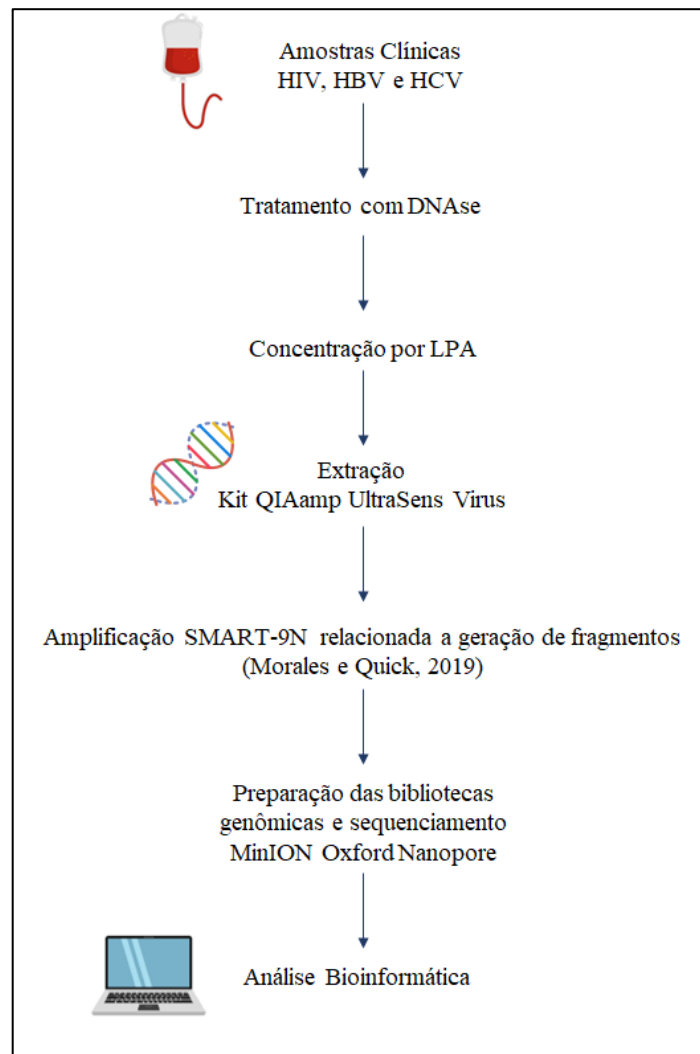


Figura 17. Fluxograma final da metodologia aplicada nas amostras clínicas.

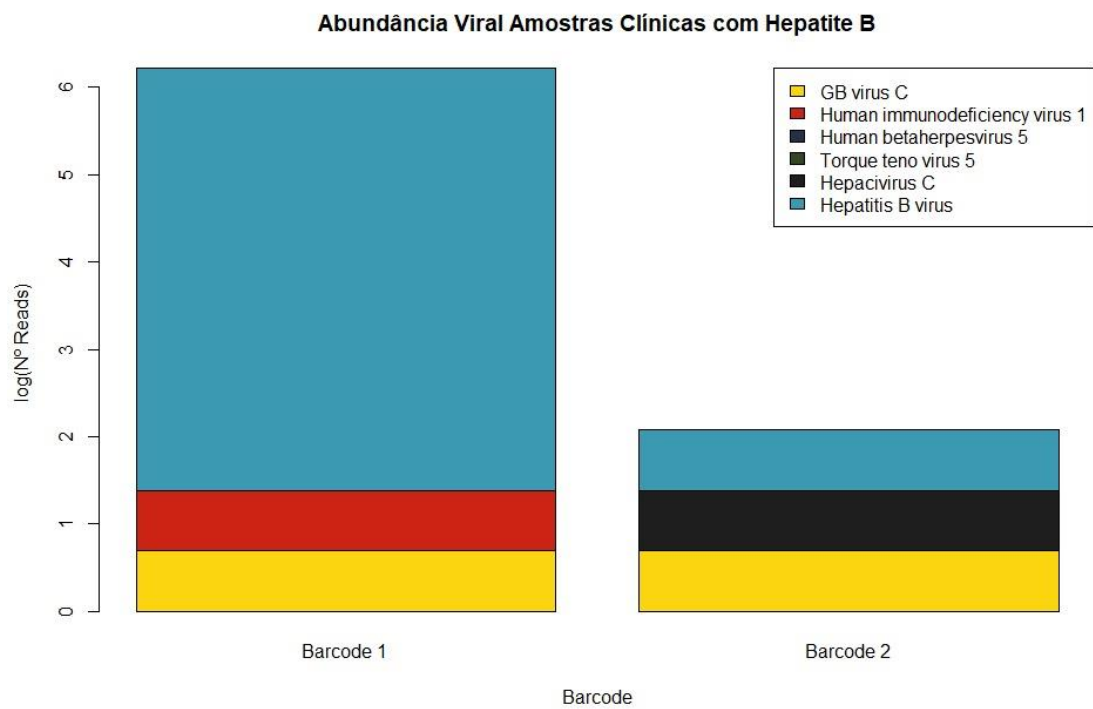


Figura 18. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HBV.

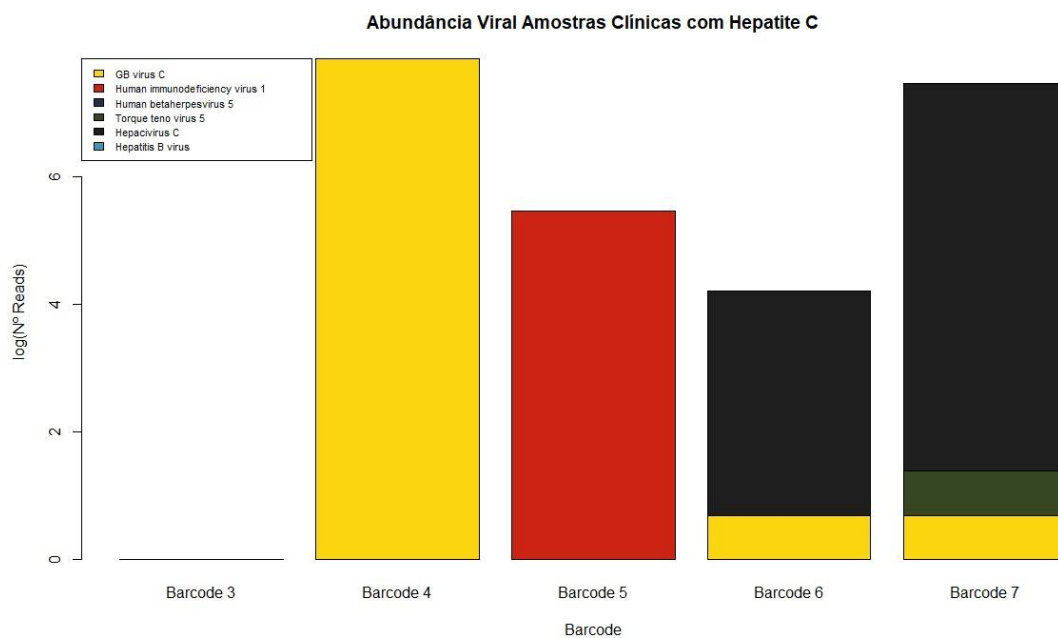


Figura 19. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HCV.

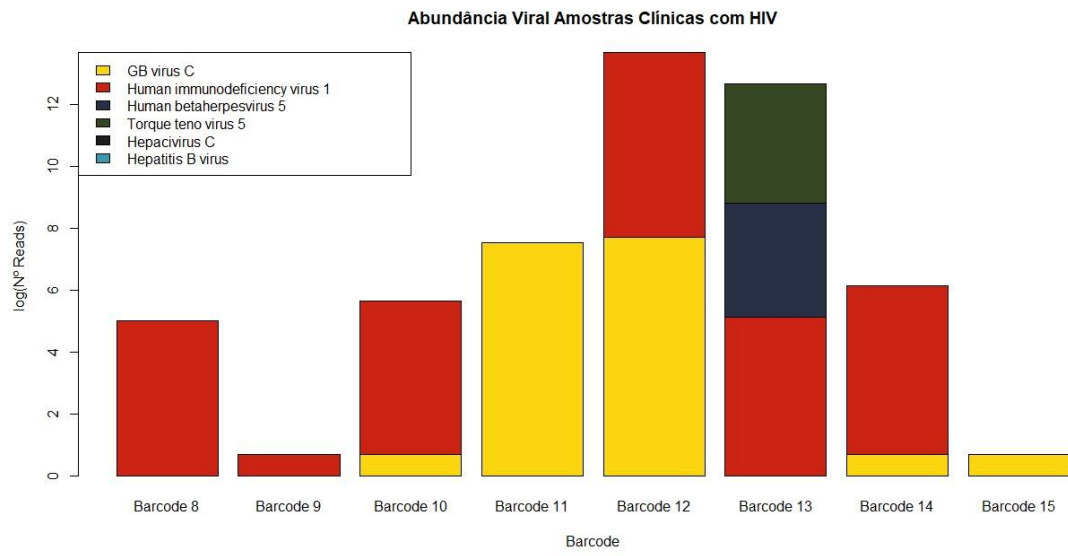


Figura 20. Abundância viral nas duas amostras clínicas com diagnóstico NAT positivo para HIV.

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós implementamos uma padronização dos procedimentos de pré-tratamento, concentração de partículas virais, extração de ácidos nucleicos e análise metagenômica utilizando a *flowcell* portátil da *Oxford Nanopore*, que é uma excelente ferramenta aplicada em regiões remotas ou com poucos recursos, quais em geral são as mais afetadas pelos surtos virais ou doenças infecciosas emergentes.

O presente trabalho foi dividido em várias etapas com a finalidade de avaliar em uma melhor escala as técnicas de pré-processamento da amostragem, extração de ácidos nucleicos e fragmentação e, assim, obter melhores resultados quando aplicados à realidade da metagenômica.

Em primeiro lugar, nós realizamos experimentos preliminares com a finalidade de avaliar os procedimentos de concentração, amplificação e preparação de bibliotecas. Nos nossos experimentos aplicamos a concentração por ultracentrifugação, seguindo o protocolo de Cebria-Mendoza et al., 2021, com menores modificações. Outro tipo de concentração de partículas virais foi a concentração química utilizando poliacrilamida linear (LPA) sob o nome comercial GenElute LPA (Merck). A realização de ultracentrifugação foi avaliada para a presença de partículas virais através de microscopia eletrônica. Nós revelamos uma grande quantidade de cabeças de fagos (alguns com caudas) e partículas de HIV (Figuras 7 e 8), o que demonstrou que a ultracentrifugação é uma técnica eficaz para concentração de vírus até de tamanhos menores que são os fagos. Cabe ressaltar que isso foi também mostrado na análise bioinformática, em que as amostras que foram concentradas através de ultracentrifugação demonstraram maior abundância viral independentemente do procedimento de extração.

Um dos maiores desafios para a metagenômica é a falta de protocolo padrão para os pré-procedimentos necessários para a preparação da amostra como remoção do material do hospedeiro e concentração das amostras. Para a remoção do material genômico da amostra testada nós utilizamos DNase de alta concentração. Este tipo de tratamento já tem sido utilizado pelo nosso grupo nos procedimentos metagenômicos e é amplamente utilizado pelos outros grupos de pesquisa (Sorensen JW et al., 2021). Este procedimento é baseado na suposição que a maioria dos virions (partículas virais) permanecem intactos, protegendo o conteúdo genômico, e, nesse procedimento, os ácidos nucleicos virais não serão afetados. Este tratamento é destinado para remoção de DNA livre que pode se encontrar junto com as partículas virais em uma amostra de qualquer origem, inclusive as amostras clínicas, como é o caso deste projeto. Em estudos que avaliaram viroma em amostras de solo foi observado que a quantidade de ácidos nucleicos contaminantes é muito alta, podendo chegar por volta de 40-50%, e isso



pode introduzir muitas sequências indesejadas no procedimento de sequenciamento, o que pode diminuir a geração de leituras virais, principalmente quando são utilizados primers randômicos (Sorensen JW et al., 2021).

Outro procedimento crítico quando se aplicam os procedimentos metagenômicos é a concentração da amostra. No caso de metagenômica é inviável utilizar carregadores (*carriers*) de ácidos nucleicos de origem animal uma vez que os mesmos podem comprometer a análise bioinformática introduzindo sequências não desejadas. Portanto, no nosso estudo, utilizamos e comparamos 2 tipos de concentração: utilizando precipitador químico (+DNase) de ácidos nucleicos e concentração por ultracentrifugação (+DNase). Até agora, para aplicações da metagenômica utilizando *Oxford Nanopore*, não foi realizado estudo que compara os métodos de concentração de partículas virais. No nosso caso, observamos que a concentração por ultracentrifugação gerou uma abundância maior de leituras virais do controle, principalmente quando combinada com a extração utilizando kit QIAGEN, bem como a amplificação de fragmentos utilizando o sistema SMART-9N. Em estudos anteriores, a ultracentrifugação com gradiente por cloreto de cério (CsCl) mostrou-se superior comparada com a precipitação com polietilenoglicol (Kleiner M et al., 2015), o que também foi observado nos nossos experimentos. Em todos os casos a aplicação de ultracentrifugação gerou uma abundância superior de leituras, não somente do vírus controle, que foi o HIV, mas também de vírus que foi ocasionalmente descrito nessa amostra que foi o adenovírus humano do tipo 5 (grupo C). Isso demonstra a grande importância dos procedimentos aplicados para purificação e concentração de partículas virais (pré-preparação das amostras) durante procedimentos metagenômicos e a sua relevância para a análise bioinformática. Um problema que foi notado foi que a ultracentrífuga é um equipamento de alto valor e que é indisponível na maioria dos lugares com escassez de infraestrutura. Por este motivo, nessas situações, pode ser realizada a concentração de ácidos nucleicos utilizando concentrador químico que também pode gerar resultados excelentes para realização de metagenômica viral.

Nesta padronização, nós decidimos utilizar como amplificação uma reação isotérmica que geralmente é utilizada para amplificação do transcriptoma partindo de quantidades mínimas de cDNA, o que é característico de infecções virais com carga muito baixa. Os experimentos preliminares demonstraram formação de precipitados com as *beads* magnéticas utilizadas na purificação das bibliotecas, o que pode ter ocasionado devido ao tamanho muito grande dos fragmentos gerados após a sua ligação em concatêmeros. Na reação, nós observamos tamanhos de fragmentos muito grandes (superando 80 kb), o que pode ter acarretado entupimento dos nanoporos e esgotamento dos reagentes. Por este motivo, nós decidimos procurar os melhores

métodos para fragmentação e assim realizar o sequenciamento por nanoporos. Assim, duas estratégias de fragmentação foram utilizadas, i.e., fragmentação mecânica e fragmentação química.

Na fragmentação mecânica utilizamos o sistema g-tube (Covaris), em que o material de alto peso molecular é repassado por um orifício de corte e dependendo da força gravitacional os fragmentos são clivados do tamanho desejado. Ao mesmo tempo, nós comparamos a recuperação viral utilizando fragmentação química por endonucleases. Em ambos os casos, nós não obtivemos resultado significativo o que tange a recuperação do controle positivo (genoma de HIV), mas observamos uma grande abundância de vírus comensais além de detecção positiva do adenovírus humano do tipo C (HAdV-C5, do inglês, *Human adenovirus serotype 5*), mas em menor número de leituras. Isso nos demonstrou que a amplificação isotérmica não é um método adequado quando se trata de sequenciamento de nanoporos, embora seja uma ótima ferramenta de metagenômica na preparação de bibliotecas do modo *Illumina*, devido as quantidades baixas de material genético que amplifica. Cabe ressaltar que a preparação de bibliotecas genômica nos procedimentos *Illumina*, depende de processo chamado de fragmentação através de cortes enzimáticos (ou tagmentação), o que não é utilizado na preparação de bibliotecas da tecnologia de sequenciamento de nanoporos. Ainda, a profundidade do sequenciamento *Illumina*, bem como a geração de leituras são muito diferentes da *Oxford Nanopore*, o que exemplifica a nossa dificuldade de obter fragmentos adequados a serem sequenciados na tecnologia da *Oxford Nanopore*. Por outro lado, é possível que o tamanho dos fragmentos gerados não é adequado para o sequenciamento de nanoporos, sendo eles bastante grandes.

A fragmentação é um passo fundamental para realização de sequenciamento de última geração e impacta de forma significativa a análise bioinformática. A distribuição das espécies no material estudado é muito irregular e o processo de fragmentação é um passo fundamental não somente da sua identificação, mas também a montagem dos *contigs*. O sucesso de classificação viral, bem como a montagem dos genomas nesses casos é limitado pelo grau de fragmentação que depende muito do tipo de sequenciamento e o comprimento do genoma (Garcia-Lopez R et al., 2015). Portanto, na nossa opinião, a fragmentação mais adequada para o sequenciamento de nanoporos é a geração de fragmentos através de amplificação por PCR utilizando primers específicos para os *barcodes*, como o descrito da Morales e Quick, 2019. É importante salientar que nós testamos este método tanto para vírus de RNA (amostra de bolsa de sangue positiva para HIV), quanto para vírus de DNA (cultivo de citomegalovírus), e, em ambos os casos, a metodologia garantiu melhores resultados na quantidade de leituras virais no

geral e para os vírus alvo das amostras. Além disso, escolhemos os pré-procedimentos em relação a facilidade de uso principalmente para trabalhos de campo, utilizando como concentrador o LPA em combinação com o kit de extração da QIAGEN, já que foram os que apresentaram melhores resultados em termos de quantidade de leituras e abundância viral.

Para comprovar a aplicação da metagenômica viral em amostras obtidas para procedimentos hemoterápicos, nós utilizamos 14 amostras de plasma positivas para viroses de triagem obrigatória por NAT obtidas do Hemocentro de Ribeirão Preto, HIV, HCV e HBV e 19 amostras de plasma obtidas do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá positivas para as mesmas viroses. Todas as amostras obtidas de Macapá demonstraram amplificação com Ct relativamente alto, o que não permitiu fazer uma análise metagenômica robusta. Considerando as amostras obtidas de Ribeirão Preto, em todos os casos, os Cts foram adequados, e, portanto, foram submetidas para a nossa pipeline de metagenômica por nanoporos (Figura 17). As amostras de HBV, geraram dados suficientes sobre a abundância viral, que além do HBV, detectou GBVC, também conhecido como pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1, do inglês, *Human pegivirus type 1*) bem como representantes dos anelovírus como TTV-5. No entanto, a análise das amostras de HCV, não revelou leituras para este agente viral em duas amostras das cinco positivas. O que observamos foi que em uma amostra foi detectado apenas pegivírus humano e na outra apenas HIV. Diversas causas podem ser contribuídas a esse resultado, sendo de origem bioinformático ou processamento de amostras. Por um lado, a análise bioinformática utiliza o programa Kraken para a classificação viral que por sua vez aplica sistemática viral utilizando fragmentos muito curtos. Como os genomas do pegivirus humano e o HCV apresentam uma grande similaridade, o programa Kraken pode ter classificado erroneamente algumas das leituras como pegivírus, independente se as mesmas pertencem ao HCV. A presença de HIV na outra amostra pode ser contribuída a contaminação com sequências virais do HIV durante os processamentos que poderia ter mudado o sequenciamento ao lado de HIV. Similarmente, em uma amostra não foram identificadas sequências de HIV, e todas as leituras pertenciam ao pegivirus humano, que pode ter desequilibrado o sequenciamento e relevado a presença apenas dessas leituras. A contaminação é um dos principais problemas do sequenciamento de última geração que pode gerar viés significativo na análise bioinformática e interpretação dos resultados. Devido a quantidades mínimas amplificáveis no sequenciamento de última geração e análise sensível bioinformática, é imprescindível tomar medidas para prevenir esse processo. As pipelines bioinformáticas também devem ser orientadas a evitar e reconhecer contaminação nos dados de sequenciamento de última geração (Sangiovanni M et al., 2019).

## **8. CONCLUSÃO**

No presente trabalho, nós pudemos testar e comparar diferentes métodos de pré-processamento das amostras para verificar qual a mais adequada para o sequenciamento MinION da Oxford Nanopore, que é interessante principalmente para estudos de campo de metagenômica onde há surtos de infecções emergentes. Dessa maneira, pudemos observar a importância dos métodos anteriores ao sequenciamento para o resultado final de leituras do material genético e sua análise. O método que propusemos está incorporando concentração química, extração de ácidos nucleicos sensível e procedimentos de preparação de bibliotecas padrão. Os procedimentos utilizando o sequenciamento de nanoporos são aplicáveis para busca de agentes virais emergentes na área de transfusão de sangue, porém muitos cuidados precisam ser tomados durante a análise bioinformática e os procedimentos de preparação de amostras para evitar contaminações e presença de artefatos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTER, MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, v. 13, n. 17, p. 2436-2441, 2007. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v13/i17/2436.htm>. doi: 10.3748/wjg.v13.i17.2436. PMID: 17552026; PMCID: PMC4146761.

BERG, MG., LEE, D., COLLER, K., FRANKEL, M., ARONSOHN, A., CHENG, K., FORBERG, K., MARCINKUS, M., NACCACHE, SN., DAWSON, G., BRENNAN, C., JENSEN, DM., HACKETT, J. Jr., CHIU, CY. Discovery of a Novel Human Pegivirus in Blood Associated with Hepatitis C Virus Co-Infection. *PLoS Pathog*, v. 11, n. 12, e1005325, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005325>. Erratum in: *PLoS Pathog*, v. 12, n. 1, e1005386, 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1005325. PMID: 26658760; PMCID: PMC4676677.

BIGGERSTAFF, BJ., PETERSEN, LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*, v. 42, n. 8, p. 1019-1026, 2002. doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00167.x. PMID: 12385413.

BRANTON, D., DEAMER, DW., MARZIALI, A., BAYLEY, H., BENNER, SA., BUTLER, T., DI VENTRA, M., GARAJ, S., HIBBS, A., HUANG, X., JOVANOVIĆ, SB., KRSTIĆ, PS., LINDSAY, S., LING, XS., MASTRANGELO, CH., MELLER, A., OLIVER, JS., PERSHIN, YV., RAMSEY, JM., RIEHN, R., SONI, GV., TABARD-COSSA, V., WANUNU, M., WIGGIN, M., SCHLOSS, JA. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*, v. 26, n. 10, p. 1146-1153, 2008. doi: 10.1038/nbt.1495. PMID: 18846088; PMCID: PMC2683588.

CAPPY, P., LEGRAN-JBILOU, S., CHABLI, L., N'DEBI, M., GALLIAN, P., BRISBARRE, N., PILLONEL, J., MOREL, P., LAPERCHE, S. SARS-CoV-2 and post-donation information: a one-year experience of the French haemovigilance network. *Blood Transfus*, v. 20, n. 5, p. 362-373, 2022. doi: 10.2450/2022.0266-21. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35175185; PMCID: PMC9480969.

CEBRIÁ-MENDOZA, M., ARBONA, C., LARREA, L., DÍAZ, W., ARNAU, V., PEÑA, C., BOU, JV., SANJUÁN, R., CUEVAS, JM. Deep viral blood metagenomics reveals extensive

anellovirus diversity in healthy humans. *Sci Rep*, v. 11, n. 1, p. 6921, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-86427-4. PMID: 33767340; PMCID: PMC7994813.

CHENG, VCC., SRIDHAR, S., WONG, SC., WONG, SCY., CHAN, JFW., YIP, CCY., CHAU, CH., AU, TWK., HWANG, YY., YAU, CSW., LO, JYC., LEE, CK., YUEN, KY. Japanese Encephalitis Virus Transmitted Via Blood Transfusion, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis*, v. 24, n. 1, p. 49-57, 2018. doi: 10.3201/eid2401.171297. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29043965; PMCID: PMC5749455.

CHIU, CY., MILLER, SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet*, v. 20, n. 6, p. 341-355, 2019. doi: 10.1038/s41576-019-0113-7. PMID: 30918369; PMCID: PMC6858796.

CLARKE, J., WU, HC., JAYASINGHE, L., PATEL, A., REID, S., BAYLEY, H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol*, v. 4, n. 4, p. 265-270, 2009. doi: 10.1038/nnano.2009.12. Epub 2009 Feb 22. PMID: 19350039.

CLARO, IM., RAMUNDO, MS., COLETTI, TM et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing [version 1; peer review: 2 approved with reservations]. *Wellcome Open Res*, v. 6, p. 241, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.1>.

CUSTER, B., GREBE, E., BUCCHERI, R., BAKKOUR, S., STONE, M., CAPUANI, L., ALENCAR, C., AMORIM, L., LOUREIRO, P., CARNEIRO-PROIETTI, AB., MENDRONE-JUNIOR, A., GONÇALEZ, T., GAO, K., LIVEZEY, KW., LINNEN, JM., BRAMBILLA, D., MCCLURE, C., BUSCH, MP., SABINO, EC.; RECIPIENT EPIDEMIOLOGY AND DONOR EVALUATION STUDY (REDS-III) INTERNATIONAL COMPONENT BRAZIL. Surveillance for Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Incidence and RNAemia in Blood Donors at 4 Brazilian Blood Centers During 2016-2019. *J Infect Dis*, v. 227, n. 5, p. 696-707, 2023. doi: 10.1093/infdis/jiac173. PMID: 35687888.

DANECEK, P., BONFIELD, JK., LIDDLE, J., MARSHALL, J., OHAN, V., POLLARD, MO., WHITWHAM, A., KEANE, T., MCCARTHY, SA., DAVIES, RM., LI, H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, v. 10, n. 2, p. giab008, 2021. doi: 10.1093/gigascience/giab008. PMID: 33590861; PMCID: PMC7931819.

DENNEHY, JJ. Evolutionary ecology of virus emergence. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1389, n. 1, p. 124-146, 2017. doi: 10.1111/nyas.13304. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28036113; PMCID: PMC7167663.

EVATT, B.L.. The tragic history of AIDS in the hemophilia population, 1982–1984. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, [S.L.], v. 4, n. 11, p. 2295-2301, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02213.x>.

FRITSCH, H., GIOVANETTI, M., XAVIER, J., ADELINO, TER., FONSECA, V., DE JESUS, JG., DE JESUS, R., FREITAS, C., PETERKA, CRL., CAMPELO DE ALBUQUERQUE, CF., BISPO DE FILIPPIS, AM., DA CUNHA, RV., SILVA, EC., ALCANTARA, LCJ., IANI, FCM. Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. *Microbiol Spectr*, v. 10, n. 5, p. e0128522, 2022. doi: 10.1128/spectrum.01285-22. Epub 2022 Aug 25. PMID: 36005767; PMCID: PMC9602355.

GARCÍA-LÓPEZ, R., VÁZQUEZ-CASTELLANOS, JF., MOYA, A. Fragmentation and Coverage Variation in Viral Metagenome Assemblies, and Their Effect in Diversity Calculations. *Front Bioeng Biotechnol*, v. 3, p. 141, 2015. doi: 10.3389/fbioe.2015.00141. PMID: 26442255; PMCID: PMC4585024.

GIOVANETTI, M., PEREIRA, LA., SANTIAGO, GA., FONSECA, V., MENDOZA, MPG., DE OLIVEIRA, C., DE MORAES, L., XAVIER, J., TOSTA, S., FRITSCH, H., DE CASTRO BARBOSA, E., RODRIGUES, ES., FIGUEROA-ROMERO, D., PADILLA-ROJAS, C., CÁCERES-REY, O., MENDONÇA, AF., DE BRUYCKER NOGUEIRA, F., VENANCIO DA CUNHA, R., DE FILIPPIS, AMB., FREITAS, C., PETERKA, CRL., DE ALBUQUERQUE, CFC., FRANCO, L., MÉNDEZ RICO, JA., MUÑOZ-JORDÁN, JL., LEMES DA SILVA, V., ALCANTARA, LCJ. Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 28, n. 8, p. 1725-1727, 2022. doi: 10.3201/eid2808.220550. PMID: 35876608; PMCID: PMC9328905.

GOODWIN, S., MCPHERSON, JD., MCCOMBIE, WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016. doi: 10.1038/nrg.2016.49. PMID: 27184599.

GRUBYTE, S., URBONIENE, J., NEDZINSKIENE, L., JELINSKAITE, A., ZAGMINAS, K., AMBROZAITIS, A., JANCORIENE, L. Prevalence, incidence and residual risk of transfusion transmitted viruses (HBV, HCV and HIV infections) in Lithuanian blood donors from 2004 to 2018: The incidence/window-period model study. *PLoS One*, v. 16, n. 2, p. e0246704, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0246704. PMID: 33606700; PMCID: PMC7894937.

GU, W., MILLER, S., CHIU, CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol*, v. 14, p. 319-338, 2019. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30355154; PMCID: PMC6345613.

HALL, RJ., WANG, J., TODD, AK., BISSIELO, AB., YEN, S., STRYDOM, H., MOORE, NE., REN, X., HUANG, QS., CARTER, PE., PEACEY, M. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods*, v. 195, p. 194-204, 2014. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.035. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24036074; PMCID: PMC7113663.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996. DOI: 10.1101/gr.6.10.986. PMID: 8908518.

KAPOOR, A., KUMAR, A., SIMMONDS, P., BHUVA, N., SINGH CHAUHAN, L., LEE, B., SALL, AA., JIN, Z., MORSE, SS., SHAZ, B., BURBELO, PD., LIPKIN, WI. Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses. *mBio*, v. 6, n. 5, p. e01466-15, 2015. doi: 10.1128/mBio.01466-15. PMID: 26396247; PMCID: PMC4600124.

KLEINER, M., HOOPER, LV., DUERKOP, BA. Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 7, 2015. doi: 10.1186/s12864-014-1207-4. PMID: 25608871; PMCID: PMC4308010.

KONO, N., ARAKAWA, K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Dev Growth Differ*, v. 61, n. 5, p. 316-326, 2019. doi: 10.1111/dgd.12608. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31037722.

LANDEGREN, U., KAISER, R., SANDERS, J., HOOD, L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, v. 241, n. 4869, p. 1077-1080, 1988. doi: 10.1126/science.3413476. PMID: 3413476.



LAU, P., CORDEY, S., BRITO, F., TIREFORT, D., PETTY, TJ., TURIN, L., GUICHEBARON, A., DOCQUIER, M., ZDOBNOV, EM., WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S., LECOMPTE, T., KAISER, L., PREYNAT-SEAUVE, O. Metagenomics analysis of red blood cell and fresh-frozen plasma units. *Transfusion*, v. 57, n. 7, p. 1787-1800, 2017. doi: 10.1111/trf.14148. Epub 2017 May 11. PMID: 28497550.

LI, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, v. 34, n. 18, p. 3094-3100, 2018. doi: 10.1093/bioinformatics/bty191. PMID: 29750242; PMCID: PMC6137996.

LIU, L., LI, Y., LI, S., HU, N., HE, Y., PONG, R., LIN, D., LU, L., LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 251364, 2012. doi: 10.1155/2012/251364. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22829749; PMCID: PMC3398667.

MAWALLA, WF., NJIRO, BJ., BWIRE, GM., NASSER, A., SUNGUYA, B. No evidence of SARS-CoV-2 transmission through transfusion of human blood products: A systematic review. *EJHaem*, v. 2, n. 3, p. 601-606, 2021. doi: 10.1002/jha2.263. PMID: 34518827; PMCID: PMC8426699.

MOKILI, JL., ROHWER, F., DUTILH, BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol*, v. 2, n. 1, p. 63-77, 2012. doi: 10.1016/j.coviro.2011.12.004. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22440968; PMCID: PMC7102772.

MORALES, Ingra Claro; QUICK, Josh. Viral metagenomics using SMART-9n amplification and nanopore sequencing v1. *Protocols.io*, 3 out. 2019. ZappyLab, Inc. Disponível em: <https://www.protocols.io/view/viral-metagenomics-using-smart-9n-amplification-an-j8nlke5wwl5r/v1>. Acesso em: [data de acesso].

MOTTA, IJ., SPENCER, BR., CORDEIRO DA SILVA, SG., ARRUDA, MB., DOBBIN, JA., GONZAGA, YB., ARCURY, IP., TAVARES, RC., ATTA, EH., FERNANDES, RF., COSTA, DA., RIBEIRO, LJ., LIMONTE, F., HIGA, LM., VOLOCH, CM., BRINDEIRO, RM., TANURI, A., FERREIRA, OC JR. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *N Engl J Med*, v. 375, n. 11, p. 1101-1103, 2016. doi: 10.1056/NEJMc1607262. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27532622.

MUKHERJEE, S. Emerging Infectious Diseases: Epidemiological Perspective. *Indian J Dermatol*, v. 62, n. 5, p. 459-467, 2017. doi: 10.4103/ijd.IJD\_379\_17. PMID: 28979007; PMCID: PMC5618832.

RAVI, RK., WALTON, K., KHOSROHEIDARI, M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. In: *Methods Mol Biol*, v. 1706, p. 223-232, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9\_12. PMID: 29423801.

REGNAULT, B., BIGOT, T., MA, L., PÉROT, P., TEMMAM, S., ELOIT, M. Deep Impact of Random Amplification and Library Construction Methods on Viral Metagenomics Results. *Viruses*, v. 13, n. 2, p. 253, 2021. doi: 10.3390/v13020253. PMID: 33562285; PMCID: PMC7915491.

RONAGHI, M., KARAMOHAMED, S., PETTERSSON, B., UHLÉN, M., NYRÉN, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*, v. 242, n. 1, p. 84-9, 1996. doi: 10.1006/abio.1996.0432. PMID: 8923969.

ROSE, R., CONSTANTINIDES, B., TAPINOS, A., ROBERTSON, DL., PROSPERI, M. Challenges in the analysis of viral metagenomes. *Virus Evol*, v. 2, n. 2, p. vew022, 2016. doi: 10.1093/ve/vew022. PMID: 29492275; PMCID: PMC5822887.

SABINO, EC., LOUREIRO, P., LOPES, ME., CAPUANI, L., MCCLURE, C., CHOWDHURY, D., DI-LORENZO-OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, LC., LINNEN, JM., LEE, TH., GONÇALEZ, T., BRAMBILLA, D., KLEINMAN, S., BUSCH, MP., CUSTER, B.; INTERNATIONAL COMPONENT OF THE NHLBI RECIPIENT EPIDEMIOLOGY AND DONOR EVALUATION STUDY-III. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. *J Infect Dis*, v. 213, n. 5, p. 694-702, 2016. doi: 10.1093/infdis/jiv326. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26908780; PMCID: PMC4747611.

SANGIOVANNI, M.; GRANATA, I.; THIND, A. S.; GUARRACINO, M. R. From trash to treasure: detecting unexpected contamination in unmapped NGS data. *BMC Bioinformatics*, v. 20, Suppl 4, p. 168, 2019. DOI: 10.1186/s12859-019-2684-x. PMID: 30999839; PMCID: PMC6472186.

SAUVAGE, V., ELOIT, M. Viral metagenomics and blood safety. *Transfus Clin Biol*, v. 23, n. 1, p. 28-38, 2016. doi: 10.1016/j.tracli.2015.12.002. Epub 2016 Jan 9. PMID: 26778104; PMCID: PMC7110881.

SHARMA, A., AHMAD FAROUK, I., LAL, SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, v. 13, n. 2, p. 202, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13020202>.

SLAVOV, S.N. Viral Metagenomics for Identification of Emerging Viruses in Transfusion Medicine. *Viruses*, v. 14, n. 11, p. 2448, 2022. doi: 10.3390/v14112448. PMID: 36366546; PMCID: PMC9699440.

STRAMER, S.L., HOLLINGER, F.B., KATZ, L.M., KLEINMAN, S., METZEL, P.S., GREGORY, K.R., DODD, R.Y. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*, v. 49, Suppl 2, p. 1S-29S, 2009. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x. PMID: 19686562.

SORENSEN, J.W., ZINKE, L.A., TER HORST, A.M., SANTOS-MEDELLÍN, C., SCHROEDER, A., EMERSON, J.B. DNase Treatment Improves Viral Enrichment in Agricultural Soil Viromes. *mSystems*, v. 6, n. 5, p. e0061421, 2021. doi: 10.1128/mSystems.00614-21. PMID: 34491084; PMCID: PMC8547471.

TIMP, W., MIRSAIDOV, U.M., WANG, D., COMER, J., AKSIMENTIEV, A., TIMP, G. Nanopore Sequencing: Electrical Measurements of the Code of Life. *IEEE Trans Nanotechnol*, v. 9, n. 3, p. 281-294, 2010. doi: 10.1109/TNANO.2010.2044418. PMID: 21572978; PMCID: PMC3092306.

UEKI, H., FURUSAWA, Y., IWATSUKI-HORIMOTO, K., IMAI, M., KABATA, H., NISHIMURA, H., KAWAOKA, Y. Effectiveness of Face Masks in Preventing Airborne Transmission of SARS-CoV-2. *mSphere*, v. 5, n. 5, p. e00637-20, 2020. doi: 10.1128/mSphere.00637-20. PMID: 33087517; PMCID: PMC7580955.

VERMEULEN, M., LELIE, N., COLEMAN, C., SYKES, W., JACOBS, G., SWANEVELDER, R., BUSCH, M., VAN ZYL, G., GREBE, E., WELTE, A., REDDY, R. Assessment of HIV transfusion transmission risk in South Africa: a 10-year analysis following implementation of individual donation nucleic acid amplification technology testing and donor

demographics eligibility changes. *Transfusion*, v. 59, n. 1, p. 267-276, 2019. doi: 10.1111/trf.14959. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30265757.

WOOD, D.E., LU, J., LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*, v. 20, n. 1, p. 257, 2019. doi: 10.1186/s13059-019-1891-0. PMID: 31779668; PMCID: PMC6883579.

## 10. APÊNDICE

### Apêndice 1: Participação em congresso com apresentação de pôster

#### XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA



Certificamos que o trabalho intitulado **OPTIMIZATION OF PORTABLE MINION SEQUENCING TECHNOLOGY FOR VIRAL METAGENOMICS IN THE FIELD OF HEMOTHERAPY**, de autoria de *Victória Simionatto Zucherato; Debora Glenda Lima de La Roque; Rochele Azevedo França; Elaine Vieira Santos; Simone Kashima; Dimas Tadeu Covas; Svetoslav Nanev Slavov* foi apresentado durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022.



  
Flávio Guimarães da Fonseca  
Presidente, SBV

## Apêndice 2: Participação em workshop com apresentação oral

II Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular e Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia



### Apêndice 3: Artigos publicados

SARS-CoV-2 serological cross-reactivity testing in Brazilian blood donors, October-December, 2019 (Journal of Infection=IF=38.0).

[Comment](#) > [J Infect.](#) 2022 Feb;84(2):e1-e2. doi: 10.1016/j.jinf.2021.12.041. Epub 2022 Jan 1.

#### SARS-CoV-2 serological cross-reactivity testing in Brazilian blood donors, October-December, 2019

Victoria Simionatto Zucherato <sup>1</sup>, Mariane Evaristo <sup>1</sup>, Elaine Vieira Santos <sup>1</sup>, Ralyria Mello <sup>2</sup>, Érika Donizetti Candido <sup>2</sup>, Danielle Bastos Araujo <sup>2</sup>, Danielle Bruna Leal de Oliveira <sup>2</sup>, Edson Luiz Durigon <sup>2</sup>, Marta Giovanetti <sup>3</sup>, Luiz Carlos Júnior Alcantara <sup>3</sup>, Daiani Cristina Cilião-Alves <sup>4</sup>, Rodrigo Haddad <sup>5</sup>, Dimas Tadeu Covas <sup>6</sup>, Simone Kashima <sup>1</sup>, Svetoslav Nanev Slavov <sup>7</sup>

Affiliations + expand

PMID: 34979220 DOI: 10.1016/j.jinf.2021.12.041

Molecular identification of the emerging Human Gemykibivirus-2 (HuGkV-2) among Brazilian blood donors

> [Transfus Apher Sci.](#) 2023 Feb;62(1):103516. doi: 10.1016/j.transci.2022.103516. Epub 2022 Jul 26.

#### Molecular identification of the emerging Human Gemykibivirus-2 (HuGkV-2) among Brazilian blood donors

Victória Simionatto Zucherato <sup>1</sup>, Marta Giovanetti <sup>2</sup>, Lara Okuyama Afonso Costa <sup>1</sup>, Luciana Maria Fontanari Krause <sup>3</sup>, Daiani Cristina Cilião Alves <sup>4</sup>, Renata Maria Alencar Moreira <sup>5</sup>, Barbara Maciel Sidou Pimentel <sup>5</sup>, Rodrigo Haddad <sup>6</sup>, Hellen Tayaná Bitencourt <sup>7</sup>, Massimo Ciccozzi <sup>8</sup>, Luiz Carlos Júnior Alcantara <sup>9</sup>, Simone Kashima <sup>1</sup>, Dimas Tadeu Covas <sup>10</sup>, Svetoslav Nanev Slavov <sup>11</sup>

Affiliations + expand

PMID: 35941020 DOI: 10.1016/j.transci.2022.103516

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA prevalence in Brazilian blood donors

> [Transfus Clin Biol.](#) 2023 Feb;30(1):143-146. doi: 10.1016/j.tradi.2022.10.007. Epub 2022 Oct 25.

#### Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA prevalence in Brazilian blood donors

Victoria Simionatto Zucherato <sup>1</sup>, Pericles Natan Mendes da Costa <sup>1</sup>, Marta Giovanetti <sup>2</sup>, Luciana Maria Fontanari Krause <sup>3</sup>, Daiani Cristina Cilião Alves <sup>4</sup>, Renata Maria Alencar Moreira <sup>5</sup>, Barbara Maciel Sidou Pimentel <sup>5</sup>, Rodrigo Haddad <sup>6</sup>, Hellen Tayaná Bitencourt <sup>7</sup>, Massimo Ciccozzi <sup>8</sup>, Luiz Carlos Júnior Alcantara <sup>9</sup>, Simone Kashima <sup>1</sup>, Dimas Tadeu Covas <sup>10</sup>, Svetoslav Nanev Slavov <sup>11</sup>

Affiliations + expand

PMID: 36306977 DOI: 10.1016/j.tradi.2022.10.007

## Metavirome composition of Brazilian blood donors positive for the routinely tested blood-borne infections

> [Virus Res.](#) 2022 Apr 2;311:198689. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198689. Epub 2022 Jan 26.

### Metavirome composition of Brazilian blood donors positive for the routinely tested blood-borne infections

Rafael Dos Santos Bezerra <sup>1</sup>, João Paulo Bianchi Ximenez <sup>2</sup>, Marta Giovanetti <sup>3</sup>, Victoria Simionatto Zucherato <sup>1</sup>, Hellen Tayaná Bitencourt <sup>4</sup>, Ana Zimmermann <sup>5</sup>, Luiz Carlos Júnior Alcantara <sup>3</sup>, Dimas Tadeu Covas <sup>6</sup>, Simone Kashima <sup>1</sup>, Svetoslav Nanev Slavov <sup>7</sup>

Affiliations + expand

PMID: 35090996 DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198689

Viral metagenomics unveils MW (Malawi) polyomavirus infection in Brazilian pediatric patients with acute respiratory disease (Journal of Medical Virology, IF=21).

## JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY

SHORT COMMUNICATION

### Viral metagenomics unveils MW (Malawi) polyomavirus infection in Brazilian pediatric patients with acute respiratory disease

Anielly S. da Silva, Gabriel Montenegro de Campos, Marta Giovanetti, Victória Simonatto Zucherato, Alex Ranieri Jerônimo Lima, Elaine Vieira Santos, Rodrigo Haddad, Massimo Ciccozzi ... [See all authors](#) ▾

First published: 22 March 2023 | <https://doi.org/10.1002/jmv.28688>

## Comparative metavirome analysis in polytransfused patients

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2021) 54(12): e11610, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11610>  
ISSN 1414-431X Research Article



1/6

## Comparative metavirome analysis in polytransfused patients

I.N. Valença<sup>1,2,\*</sup>, F.A. Rós<sup>1,2,\*</sup>, V.S. Zucherato<sup>2</sup>, A.C. Silva-Pinto<sup>2</sup>, D.T. Covas<sup>2</sup>, S. Kashima<sup>2</sup>, and S.N. Slavov<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>2</sup>Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>3</sup>Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Metagenomic insights into the plasma virome of Brazilian patients with prostate cancer.



## Metagenomic insights into the plasma virome of Brazilian patients with prostate cancer

Dalila Luciola Zanette<sup>a</sup>, Karoline Brito Caetano Andrade Coelho<sup>b</sup>, Eneas de Carvalho<sup>c</sup>, Mateus Nobrega Aoki<sup>a</sup>, Jeanine Marie Nardin<sup>d</sup>, Larissa Araújo Lalli<sup>a</sup>, Rafael dos Santos Bezerra<sup>e</sup>, Marta Giovanetti<sup>f,g</sup>, Victória Simionatto Zucherato<sup>e</sup>, Gabriel Montenegro de Campos<sup>e</sup>, Jardelina de Souza Todão Bernardino<sup>c</sup>, Vincent Louis Viala<sup>c</sup>, Massimo Ciccozzi<sup>h</sup>, Luiz Carlos Junior Alcantara<sup>g</sup>, Sandra Coccuzzo Sampaio<sup>c</sup>, Maria Carolina Elias<sup>c</sup>, Simone Kashima<sup>e</sup>, Dimas Tadeu Covas<sup>c,e</sup>, and Svetoslav Nanev Slavov<sup>c,e</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Applied Science and Technology in Health, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Professor Algacyr Munhoz Mader, Curitiba, Parana, Brazil; <sup>b</sup>Department of Anatomy and Surgery, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil; <sup>c</sup>Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>d</sup>Department of Urology, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Parana, Brazil; <sup>e</sup>Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil; <sup>f</sup>Department of Science and Technology for Humans and the Environment, University of Campus Bio-Medico di Roma, Rome, Italy; <sup>g</sup>Laboratory of Flaviviruses, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>h</sup>Epidemiology and Statistic Unit, University of Campus Bio-Medico di Roma, Rome, Italy

### ABSTRACT

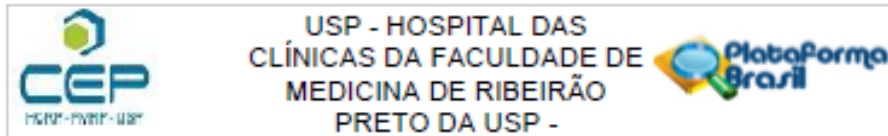
Growing evidence suggests that metavirome changes could be associated increased risk for malignant cell transformation. Considering Viruses have been proposed as factors for prostate cancer induction. The

### ARTICLE HISTORY

Received 3 November 2022  
 Revised 2 March 2023  
 Accepted 2 March 2023

## 11. ANEXO

### Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Aplicação da Tecnologia Portátil MinION para Análise do Metagenoma Viral

**Pesquisador:** VICTORIA SIMIONATTO ZUCHERATO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 57499522.5.0000.5440

**Instituição Proponente:** Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

**Patrocinador Principal:** Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto  
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO  
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.354.682

##### Apresentação do Projeto:

As tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (SNG) têm crescido aceleradamente nos últimos anos permitindo assim a geração madura de dados genômicos de forma simultânea, imparcial e rápida. Uma das principais aplicações do SNG é a metagenômica que contribui para identificação de agentes patogênicos emergentes, assinaturas genômicas, transformando assim a medicina. Embora a principal plataforma mundial de obtenção de dados metagenômicos seja representada pela marca Illumina, este equipamento tem alto custo, exige recursos humanos capacitados e necessita de infraestrutura altamente sofisticada. Diante desse cenário, uma técnica que vem ganhando espaço no cenário científico, é a plataforma portátil MinION, que apresenta baixo custo, não necessita de infraestrutura aprimorada e, portanto, pode ser utilizada para estudos de campo em regiões remotas que na maioria dos casos são afetadas pelos surtos emergentes. No entanto, a plataforma MinION tem sido raramente aplicada para estudos metagenômicos devido a falta de adequada padronização tanto para o processo de obtenção de metagenoma como os passos de preparação de amostras como concentração viral e extração. Dessa maneira, o objetivo desse projeto é padronizar a tecnologia MinION com a finalidade de obter e analisar o metaviroma de doadores de sangue previamente infectados com agentes virais como HBV, HIV e HCV de Ribeirão Preto-SP. Os resultados deste estudo permitirão além de ter informação sobre a composição do viroma dos doadores brasileiros de alto risco, irão possibilitar

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hosp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Protocolo: 5.354.682

a aplicação da tecnologia MinION na área de metagenômica viral e vigilância epidemiológica molecular.

**Objetivo da Pesquisa:**

Padronizar, avaliar o metaviroma e caracterizar os dados bioinformáticos virais obtidos através da tecnologia MinION

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** As amostras utilizadas serão amostras descartadas devido ao resultado positivo molecular para os agentes virais HIV, HBV e HCV, e somente serão aplicadas para padronização do processo de sequenciamento MinION e recuperação do genoma viral. Devido ao fato que nesse estudo serão utilizadas apenas amostras descartadas solicita-se a dispensa de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) já que não terá coleta relacionada a esclarecimentos aos participantes. Em nenhum momento serão utilizados dados pessoais dos doadores que compunham o grupo do estudo incluído neste projeto de pesquisa.

**Benefícios:** Não há benefícios. As amostras utilizadas serão amostras descartadas devido ao resultado positivo molecular para os agentes virais HIV, HBV e HCV, e somente serão aplicadas para padronização do processo de sequenciamento MinION e recuperação do genoma viral. Devido ao fato que nesse estudo serão utilizadas apenas amostras descartadas solicita-se a dispensa de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) já que não terá coleta relacionada a esclarecimentos aos participantes. Em nenhum momento serão utilizados dados pessoais dos doadores que compunham o grupo do estudo incluído neste projeto de pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Serão obtidas 30 amostras de plasma de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, diagnosticados com alguma infecção viral, dentre as quais podem ser HIV (vírus da imunodeficiência humana), HBV (hepatite B) e HCV (hepatite C) (10 amostras de plasma de cada agente viral). As amostras utilizadas serão amostras descartadas devido ao resultado positivo molecular do agente patogênico em questão e somente serão aplicadas para padronização do processo de sequenciamento MinION e recuperação do genoma viral. Neste estudo serão utilizadas apenas amostras descartadas e não terá coleta com relacionada a esclarecimentos aos participantes. Em nenhum momento serão utilizados dados pessoais dos doadores que compunham o grupo do estudo incluído neste projeto de pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3603-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.354.602

Consentimento Livre e Esclarecido. Serão obtidas 30 amostras de plasma de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, diagnosticados com alguma infecção viral, dentre as quais podem ser HIV (vírus da imunodeficiência humana), HBV (vírus da hepatite B) e HCV (vírus da hepatite C) (10 amostras de plasma para cada agente viral). As amostras utilizadas serão amostras descartadas devido ao resultado positivo molecular do agente patogênico em questão e somente serão aplicadas para padronização do processo de sequenciamento MINION e recuperação do genoma viral.

**Recomendações:**

não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

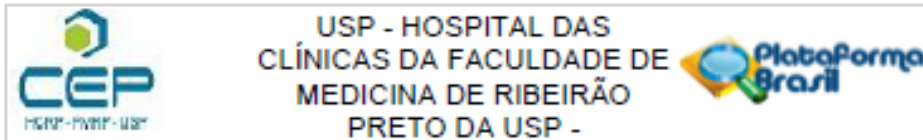
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                               | Situação |
|---|---|------------------------|-------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1891484.pdf | 04/04/2022<br>16:07:52 |                                     | Acelto   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Mestrado_Comite_Etica.pdf             | 04/04/2022<br>16:05:43 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Acelto   |
| Solicitação registrada pelo CEP           | UPC.pdf                                       | 29/03/2022<br>11:17:06 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Acelto   |
| Orçamento                                 | Orçamento_Financeiro.pdf                      | 22/03/2022<br>15:34:06 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Acelto   |
| Declaração de concordância                | Declaracao_Concordancia_Rochele.pdf           | 22/03/2022<br>11:34:38 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Acelto   |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 5.354.602

|   |                                      |                        |                                     |        |
|---|--------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------|
| Folha de Rosto  | Folha_de_Rosto_Plataforma_Brasil.pdf | 22/03/2022<br>11:33:28 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Solicitacao_Dispensa_TCLE.pdf        | 03/03/2022<br>15:53:13 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Infraestrutura_Institucional.pdf     | 03/03/2022<br>15:52:24 | VICTORIA<br>SIMIONATTO<br>ZUCHERATO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 18 de Abril de 2022

---

Assinado por:  
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA  
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-000  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hgrp.usp.br