

# Metagenómica, la técnica que “descubre” nuevos virus

Consuelo Rubio-Guerri, Marina Vicente-Rubiano, Jose Manuel Sánchez-Vizcaíno

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)

Universidad Complutense de Madrid

Ante el reciente “descubrimiento” del virus de Schmallenberg gracias a las técnicas metagenómicas, muchos compañeros se preguntan: y ¿qué es la metagenómica? En este artículo intentaremos desvelar de una manera muy divulgativa, las ventajas y desventajas de esta técnica y cuáles son sus aplicaciones en veterinaria.

## ¿Qué es la metagenómica?

Es un conjunto de técnicas que permite obtener todos los fragmentos de ADN y ARN (huellas genéticas) que contiene una muestra concreta, para luego traducirlos a un lenguaje que pueda ser leído (secuenciación) y compararlos con todas las huellas genéticas conocidas y publicadas hasta el momento, almacenadas en bases de datos como GenBank. En definitiva, se basa en obtener las secuencias de ADN y ARN de las muestras objeto de estudio y compararlas con todas las secuencias conocidas, permitiéndonos buscar la homología entre ambas.

## ¿Cuáles son los pasos a seguir para realizar técnicas metagenómicas?

En la Figura 1 resumimos las distintas etapas de la técnica (de la A a la E). Este protocolo es una combinación de técnicas moleculares convencionales y novedosas.

En primer lugar se elimina todo el material genético no encapsulado (ácidos nucleicos del hospedador), para evitar la amplificación del mismo, que de lo contrario enmascararía la amplificación de los virus. Para ello, se lleva a cabo un tratamiento enzimático que elimina el ADN y el ARN que no esté “protegido” tal y como ocurre en los virus, que al poseer una cápside no se verán afectados por este tratamiento (Figura 2). Así, al terminar este paso, sólo quedarán en la muestra los ácidos nucleicos virales.

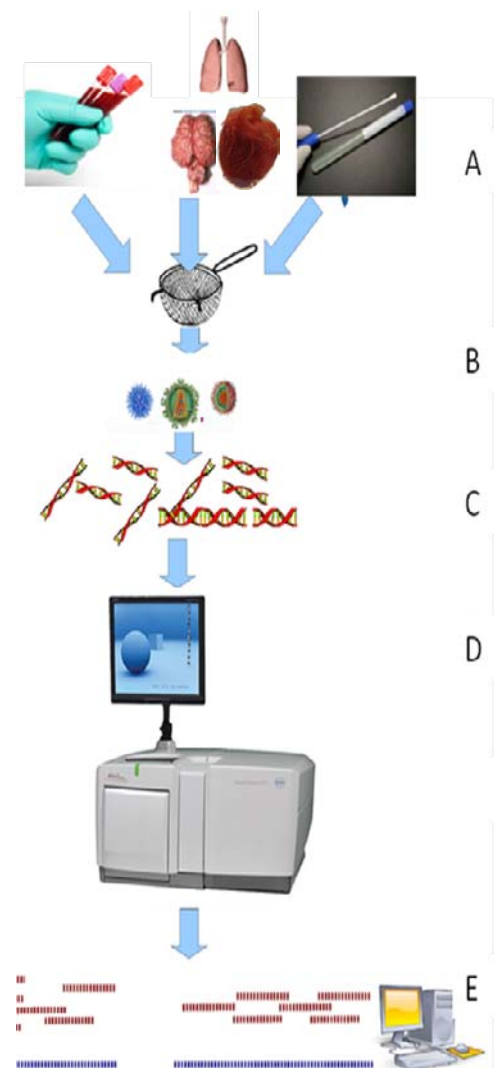
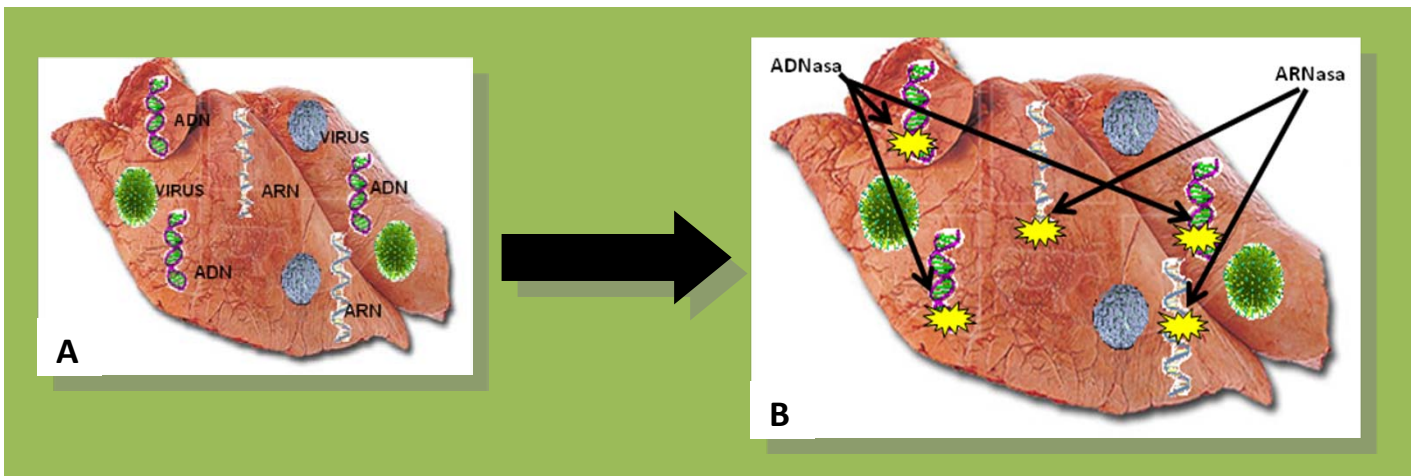
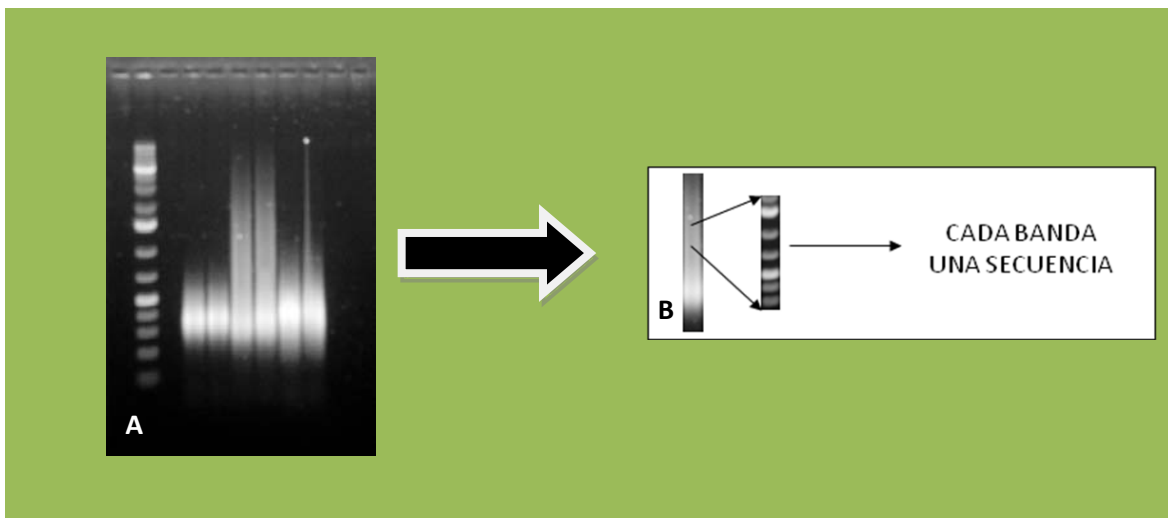


Figura 1: Esquema general del rastreo metagenómico. (A) Las muestras pueden ser sangre, tejidos, hisopos, etc. (B) Eliminación de los ácidos nucleicos del hospedador para mantener sólo los virus. (C) Amplificación masiva. (D) Secuenciación a gran escala. (E) Análisis de las secuencias y comparación con las bases de datos ya existentes.



**Figura 2: Paso 1**→Tratamiento enzimático de las muestras que se van a analizar con metagenómica. (A) Pulmón con presencia de ADN y ARN del hospedador y presencia de virus. (B) Tras el tratamiento enzimático sólo quedan los virus.

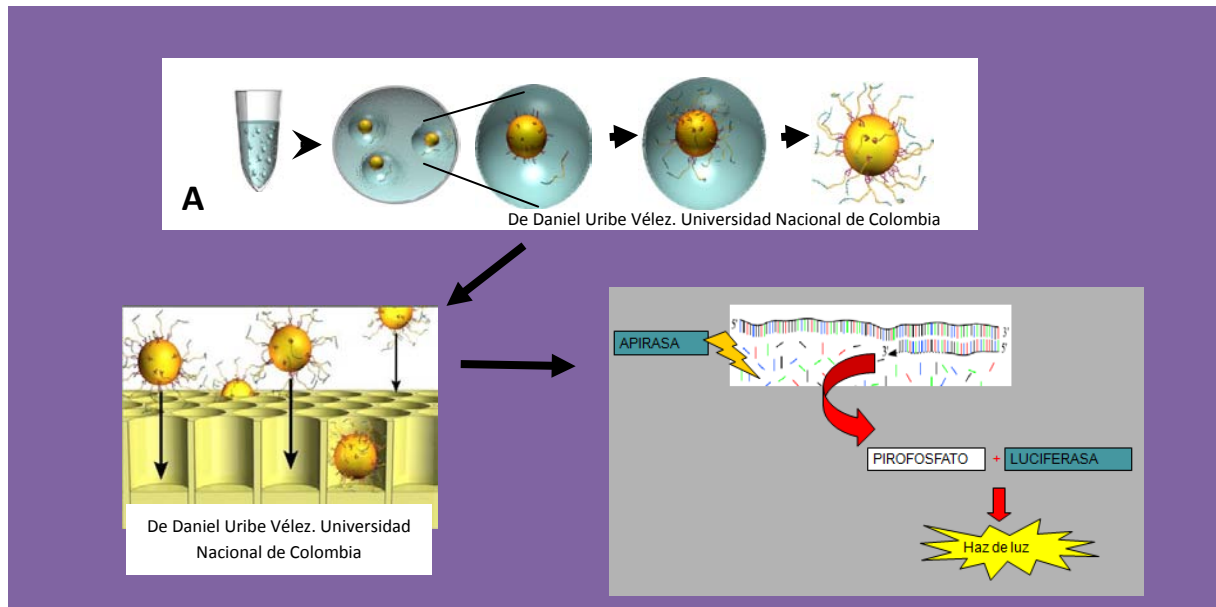
El segundo paso se basa en la amplificación de todo el ADN y ARN mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, con la diferencia de que los cebadores que se utilizan se unen a todo el ADN y ARN que esté presente en la muestra (Figura 3).



**Figura 3: Paso 2**→Amplificación al azar. (A) Gel de agarosa al 1% con el producto amplificado. Se pueden observar *smears*. (B) Cada *smear* está formado por productos de PCR de todos los tamaños.

El tercer paso es la secuenciación a gran escala. En este paso se pueden utilizar tres plataformas distintas de secuenciación (sanger, pirosecuenciación o ultrasecuenciación) aunque la más utilizada es la pirosecuenciación. Ésta utiliza una PCR en emulsión (Figura 4A) en la que realiza una amplificación clonal de cada

fragmento de ADN en una gota individual. Las gotas son añadidas junto con todas las enzimas necesarias para la pirosecuenciación en una placa de pirotitulación que contiene 2.000 pocillos (Figura 4B). La secuenciación ocurre gracias a una reacción enzimática con la secuencia que emite un haz de luz que es directamente proporcional al nucleótido que está leyendo (Figura 4C). Por tanto, el ADN y ARN amplificado en el paso anterior se va a traducir a un lenguaje que nos permite compararlo con las secuencias existentes en las bases de datos.



**Figura 4: Paso 3→Secuenciación a gran escala. (A) PCR en emulsión.** En cada una de las gotas se encuentra cada uno de los fragmentos de las secuencias, junto con los componentes necesarios para realizarse la PCR. Al final del proceso se tiene la secuencia amplificada. **(B)** Cada una de las microgotas con la secuencia amplificada se introduce en unos de los pocillos del pirosecuenciador (454) junto a los nucleótidos y las enzimas pertinentes (luciferasa y apirasa). **(C)** Proceso por el cual se lee la secuencia. Al unirse cada uno de los nucleótidos a la secuencia amplificada emite un pirofosfato, que reacciona con la luciferasa emitiendo un haz de luz. La intensidad del haz de luz es distinta para cada uno de los nucleótidos, lo cual permite conocer la composición de la secuencia.

El cuarto paso es el análisis bioinformático de las millones de secuencias obtenidas (ya traducidas a un lenguaje legible), y la comparación de las mismas con las secuencias que se encuentran en todas las bases de datos (GenBank, EMBL, DDBJ, etc.). Así gracias a las homologías entre ellas se identifican los agentes virales en la muestra problema. El último paso es el diseño de una PCR del virus identificado para así poder diagnosticarlo a través de técnicas convencionales.

**¿Qué ventajas e inconvenientes tiene con respecto a las técnicas moleculares convencionales?**

La metagenómica es una adaptación de las técnicas moleculares convencionales, ya que utiliza la PCR convencional, pero con unos cebadores degenerados que se unen a cualquier fragmento de ADN y ARN que se encuentren en la muestra.

Por ello la gran ventaja de la metagenómica es que identifica cualquier agente infeccioso que se encuentre en la muestra estudiada (Delwart, 2007) por comparación con las secuencias ya conocidas y publicadas. Además, con la metagenómica es posible detectar e identificar distintos agentes simultáneamente, partiendo de cualquier tipo de muestra. Como siempre, existe un pro y un contra para todo y el gran inconveniente de esta técnica es que actualmente la pirosecuenciación es una técnica cara.

### **¿Qué aplicaciones tiene esta técnica?**

Este protocolo, que parece muy complejo, es realmente útil tal y como se demuestra en numerosos estudios. En veterinaria, gracias a esta técnica, se ha podido estudiar la implicación de un nuevo virus boca-like en el síndrome multisistémico de desmedro postdestete (PMWS) (Blomstrom et al., 2009) o la detección de un nuevo astrovirus como causante del síndrome de la sacudida en el visón (Blomstrom et al., 2010). Y sin duda, recientemente del virus de Schmallerberg. En nuestro grupo se ha detectado a través de esta técnica y por primera vez en Europa la coinfección de IAPV y ALPV en abejas (Granberg et al., Submitted).

En definitiva, con los últimos avances, la metagenómica ha pasado de tener una aplicación solamente en investigación, a ser una técnica de diagnóstico rutinaria.

**!!!Bienvenida sea la metagenómica a la Sanidad Animal!!!**