

Bioterrorismo: o “Estado da Arte” da detecção de Agentes Patogênicos



VICTOR HUGO GIORDANO DIAS¹
PROF. DR. RODRIGO SOARES DE MOURA NETO²
MARCOS DORNELAS RIBEIRO³
PROFA. DRA. CLARISSA DAMASO⁴
PROFA. DRA. ROSANE SILVA⁴

RESUMO

Apesar do termo bioterrorismo ter ficado mais conhecido mundialmente após o caso ocorrido com esporos de *Bacillus anthracis* nos EUA em 2001, a utilização de patógenos como arma biológica já estava presente ao longo da história, mesmo que de forma rudimentar. Os agentes mais visados no bioterrorismo são classificados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) americano de acordo com a prioridade e facilidade de disseminação na população. Os ataques intencionais podem ter grande impacto na população mundial, prejudicando a economia e saúde pública caso não haja infraestrutura e preparo dos países para identificar um surto e enfrentar o alastramento de doenças. O avanço da ciência permitiu não somente o desenvolvimento de novas técnicas de detecção, mas também a manipulação de microrganismos. Este trabalho descreve como vem sendo abordado o bioterrorismo através da história até os dias atuais, e quais são as principais tecnologias utilizadas para detecção de um possível ataque, para que se possa haver um planejamento estratégico de combate por parte do governo e sistemas de saúde.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Sequenciamento Paralelo Massivo; Genoma Bacteriano.

ABSTRACT

Although the term bioterrorism became more known worldwide after the case of *Bacillus anthracis* spores in the USA in 2001, the use of pathogens as a biological weapon has been present throughout history, even if in a rudimentary way. The most targeted agents in bioterrorism are classified by the *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) according to the priority and ease of dissemination in the population. Intentional attacks can have a major impact on the world population, affecting the economy and public health if there is no infrastructure or countries are unprepared to identify an outbreak to prevent the spread of the diseases. The improvement of science allowed not only the development of new detection techniques, but also the manipulation of microorganisms. This work describes how bioterrorism has been approached throughout the history, and which are the main technologies used to identify a possible attack, to build a strategic plan by the government and health systems.

Keywords: Polymerase Chain Reaction (PCR); Massively Parallel Sequencing; Bacterial Genome.

1 Biólogo, mestre em biotecnologia. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. victorhdias@gmail.com.

2 Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3 Tenente-coronel. Instituto de Biologia do Exército (IBEx), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

4 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O Bioterrorismo é definido como a liberação intencional e planejada de agentes patogênicos ou toxinas em uma determinada população. Ações bioterroristas utilizam agentes biológicos capazes de promover grandes epidemias, instaurar pânico na população e sobrecarregar os sistemas de saúde, geralmente motivadas por razões políticas (FRISCHKNECH, 2003; MORSE; BUDOWLE, 2006).

Já na guerra biológica, as ações estão mais ligadas a uma ofensiva militar, com objetivo de debilitar o oponente para evitar um contra-ataque, assim como adoecer ou matar o maior número possível de pessoas da população e forças armadas, plantações e animais de pecuária (CARDOSO; CARDOSO, 2011; CASHMAN, 2008).

Os agentes que representam grande ameaça à saúde pública podem ser utilizados como armas biológicas. Casos isolados de doenças, surtos naturais e até mesmo a dispersão intencional desses agentes tem influência na segurança de um país e até mesmo na população mundial (WHO, 2004).

Os agentes mais visados para serem utilizados como arma biológica são principalmente aqueles que tem transmissão pessoa-pessoa, podem ser cultivados, são de fácil manipulação, tem estabilidade no ambiente, fácil disseminação, alta taxa de morbidade e mortalidade e a inexistência de diagnóstico e medidas terapêuticas da doença (HENDERSON, 1999), podendo ser dispersos pelo ar, comidas contaminadas, em pó ou via vetores artrópodes (MORSE; BUDOWLE, 2006).

As características que dividem os microrganismos relevantes à saúde pública em grupos de risco são semelhantes às do bioterrorismo. Os principais pontos levados em consideração, segundo a OMS, são a virulência do patógeno e severidade da doença, capacidade de causar doença em humanos e/ou animais, meios de transmissão e disponibilidade de prevenção, tratamento ou contenção (WHO, 2004).

Esta revisão tem como objetivo descrever a abordagem do bioterrorismo através da história até os dias atuais, e quais as principais tecnologias usadas para detecção de um possível ataque, visando um planejamento estratégico de combate, por parte do governo e sistemas de saúde.

2. ARMAS BIOLÓGICAS

As armas biológicas são umas das mais perigosas dentre aquelas que têm como objetivo a destruição em massa, como as armas químicas e nucleares. Os sistemas governamentais geralmente estão mais preparados para uma resposta a essas duas últimas, pois seus efeitos e disseminação são percebidos em um menor período de tempo, como por exemplo, nos casos de incêndio, os quais logo se têm sinais de fumaça e propagação de fogo pela região. As bombas nucleares além da grande destruição do local de impacto tem efeito instantâneo e para as armas químicas existem pessoal mais capacitado para conter e identificar os possíveis danos (DANZIG; PB, 1997; HENDERSON, 1999; MORSE; BUDOWLE, 2006).

No caso de um ataque bioterrorista os efeitos podem ser muito mais lentos e silenciosos. A liberação de esporos de um patógeno através de aerossóis, por exemplo, no qual gás pode ser incolor e inodoro, penetrando e se disseminando em várias áreas até mesmo no interior de casas, centros comerciais e empresas. As pessoas de determinada região começam a adoecer de maneira que isso passa a ser confundido com um surto natural de alguma doença. Os sintomas normalmente surgem dias ou semanas após a execução do ataque. Pacientes em hospitais, trabalhadores nas suas empresas e alunos e funcionários de escolas se contaminam e a doença começa a se espalhar e só então as suspeitas de um ataque intencional começam a ser investigadas. A distinção desses casos depende do conhecimento epidemiológico das doenças endêmicas e de evidências laboratoriais



provenientes dos indivíduos afetados para análises forenses específicas (HENDERSON, 1999; MORSE; BUDOWLE, 2006).

Depois da suspeita de um ataque com determinado agente biológico é preciso ter uma confirmação laboratorial da doença, medidas de resposta, como estoque de antibióticos e vacinas, quarentena das pessoas contaminadas, identificação do patógeno e sua fonte de origem, além do possível responsável pelo ataque, seja ele um indivíduo, grupo ou organização militar ou terrorista (HENDERSON, 1999; MORSE; BUDOWLE, 2006; VALDIVIA-GRANDA, 2012).

3. CLASSIFICAÇÃO DOS AGENTES PATOGÊNICOS

Os patógenos que podem ser usados como arma biológica, tais como *Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*, são classificados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA), organização responsável pela monitoração de doenças que afetem a população, em categorias de risco A, B e C, em ordem decrescente de prioridade e facilidade de disseminação na população (Quadro 1) (BUDOWLE *et al.*, 2011; CHUGH, 2019; MORSE; BUDOWLE, 2006). A categoria A inclui organismos que produzem doenças mais prováveis de causar mortalidade em massa e criar pânico como, por exemplo, bactérias causadoras do Antraz (*B. anthracis*), Botulismo (*Clostridium botulinum*) e Peste Negra (*Y. pestis*); e vírus causador da varíola (Varíola major virus) e febres hemorrágicas (vírus Ebola, Marburg, vírus da febre de Lassa, Machupo e Junín). Na categoria B estão os organismos que se replicam em águas e de fácil disseminação como espécies de cianobactérias produtoras de toxinas, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.* e bactérias causadoras da cólera, tifo, febre Q, além de vírus causadores de encefalites, tais como vírus da Encefalite Equina do Oeste, vírus da Encefalite Venezuelana, entre outros. Na categoria C estão incluídos microrganismos que, se manipulados geneticamente no futuro, podem se tornar ameaçadores como o Hantavírus, vírus Nipah, vírus da febre amarela (KHAN; MORSE; LILLIBRIDGE, 2000; PINTO, 2013).

Quadro 1. Divisão dos agentes patogênicos nas categorias A, B e C, por ordem decrescente de prioridade e disseminação.

| CATEGORIA | DESCRIÇÃO | EXEMPLO DE PATÓGENOS |
|-----------|---|---|
| A | Fácil disseminação ou transmissão pessoa-pessoa; alta mortalidade; maior impacto para saúde pública; causar pânico na população | <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Francisella tularensis</i> , vírus da varíola, vírus Ebola, Marburg, vírus da febre de Lassa, Machupo e Junín |
| B | Moderadamente fácil de disseminar; moderada morbidade; baixa mortalidade; exige capacidade de diagnóstico e vigilância da doença | <i>Coxiella burnetti</i> , <i>Brucella sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , vírus da Encefalite Equina do Oeste, vírus da Encefalite Venezuelana |
| C | Patógenos emergentes que podem ser manipulados geneticamente para serem usados como arma biológica; facilidade de produção e disseminação; alta morbidade e mortalidade | Vírus da Febre Amarela, Hantavirus, vírus Nipah |

Fonte: Center for Disease Control and Prevention (CDC).

4. HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS

Apesar do tema ter se tornado popular nos anos 2000 a utilização de microrganismos como arma já estava presente ao longo da história. Quando as doenças infecciosas se espalham rapidamente e são mortais podem causar diversos problemas à população, e por isso os homens começaram a utilizar esses patógenos como uma forma de ataque.

Inicialmente os microrganismos eram empregados de forma intuitiva e rudimentar. Os homens de Neandertal, por exemplo, utilizavam flechas com fezes de animais para causar infecções em seus inimigos (CHRISTOPHER, 1997; SILVA, 2001). Além disso, ataques deliberados de agentes patogênicos foram utilizados recorrentemente como estratégia para conquistas territoriais ao longo da História. Em 1347 os Tártaros lançaram cadáveres de pessoas mortas pela Peste por muros na cidade de Caffa (atualmente Teodósia, Ucrânia) através de catapultas, o que leva alguns pesquisadores a acreditarem que esta foi a forma de entrada da Peste Negra na Europa, epidemia que matou aproximadamente 60% da população (BACON, 2003; CHRISTOPHER, 1997; WHEELIS, 2002).

Em 1763 o exército britânico enviou cobertores utilizados por pacientes que morreram de varíola para os nativo-americanos aliados aos franceses durante a Guerra Franco-Indígena na América do Norte (BACON, 2003; SILVA, 2001). Durante a Primeira Guerra Mundial os alemães desenvolveram diversas armas biológicas. As bactérias *Bacillus anthracis* e *Burkholderia mallei*, por exemplo, foram utilizadas para contaminar comida de ovelhas romenas que seriam transportadas para a Rússia. Estes patógenos também foram a ferramenta usada para a contaminação intencional de equinos da cavalaria francesa (BACON, 2003; CHRISTOPHER, 1997).

Por conta dos diversos casos envolvendo armas biológicas e químicas ao longo da história, um tratado através do Protocolo de Genebra em 1925 foi realizado, o qual proibia a utilização de armas químicas e biológicas em guerras, entretanto não mencionava nada sobre produção, armazenamento e transporte das mesmas (CHRISTOPHER, 1997; FRISCHKNECH, 2003). Apesar disso, durante a Segunda Guerra Mundial o Japão continuou com experimentos envolvendo armas biológicas, os quais prisioneiros de guerra eram infectados com diferentes tipos de bactérias, além de ataques a cidades chinesas, entre 1939 a 1945 (CHRISTOPHER, 1997; FRISCHKNECH, 2003; HARRIS, 1942; OSTERHOLM, 2001). Ainda nesse período, no ano de 1947 a 1991, na Guerra Fria, potências como a União Soviética, Estados Unidos da América, Canadá e Reino Unido também desenvolveram projetos com armas biológicas. Em 1950, culturas de bactérias *Serratia marcescens* foram colocadas na Baía de São Francisco (EUA) para monitorar como a possível arma biológica se espalha. Era esperado que a bactéria fosse inofensiva, entretanto houve onze casos de infecção por *Serratia* e uma morte reportados em um hospital local dias após experimentos (BACON, 2003; MOBLEY; USAR, 1995). Uma epidemia de Antraz ocorreu em 1979 contaminando pessoas que moravam perto de uma zona militar soviética que fazia pesquisa com microbiologia, suspeita de ser com armas biológicas, através de uma liberação de esporos de *B. anthracis* no ar (CHRISTOPHER, 1997).

Um exemplo de contaminação intencional por bactéria, descartando um surto natural da doença, aconteceu em Oregon (EUA) em 1984: clientes e trabalhadores de diversos restaurantes foram infectados pela bactéria *Salmonella enterica Typhimurium* devido à ingestão ou contato com saladas, por conta de uma ação de um grupo religioso local. A hipótese de contaminação da água, má refrigeração dos alimentos ou de transmissão pelos empregados foi desconsiderada e a cepa encontrada nas amostras era a mesma que uma cepa laboratorial (ATLAS, 2002; SILVA, 2001; TOROK, 1997).

Outro exemplo de liberação intencional, contudo sem danos diretos ao ser humano, aconteceu no Sul da Bahia, no final da década de 80. Uma infestação devastadora, conhecida como vassoura-da-bruxa, atacou as plantações de cacau. Foram encontrados galhos de árvore de cacau infectados com o fungo amarrados aos pés de cacau da plantação. Quase vinte anos depois se descobriu que fora um ataque intencional, gerado por motivos políticos,



que teve consequências econômicas muito sérias, reduzindo a produção de cacau em 75% na década seguinte ao ataque (FIORAVANTI, VELHO, 2011; DEFESANET, 2006).

Novamente a preocupação global do uso de agentes biológicos como arma fez com que países reunissem esforços para maior controle e vigilância acerca do bioterrorismo e para evitar que essas armas de destruição em massa se tornassem as novas "bombas nucleares. Em 1972 aconteceu a Convenção sobre a proibição de Armas Biológicas e Toxinas (CPAB), na qual foi determinada a destruição dos estoques dos patógenos categorizados como possíveis armas biológicas e a proibição do desenvolvimento, produção, estocagem e aquisição destas ferramentas para guerra (FRISCHKNECH, 2003; NIXDORFF, 2006).

O clássico caso do atentado bioterrorista utilizando esporos de *B. anthracis* em 2001 nos EUA foi um marco para a popularização do tema ao redor do mundo. Cartas contaminadas com esporos, aparentando um pó branco, foram enviadas para profissionais da mídia e senadores do país. As amostras foram ligadas a culturas de um laboratório do governo, *US Army Medical Research Institute for Infectious Diseases*, intensificando as suspeitas de atentado bioterrorista (ATLAS, 2002; CHUGH, 2019; FRISCHKNECH, 2003; WALSH; MOR; HOSSAIN, 2019). O ataque também estimulou a criação do *Biowatch program* em 2003, no qual são monitoradas amostras ambientais do ar através de filtros, para assim alertar sobre um possível ataque bioterrorista, ou surto ambiental (INSTITUTE OF MEDICINE AND NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011; DUNBAR *et al.*, 2018).

5. SURTO NATURAL DE DOENÇAS OU ATAQUE INTERNACIONAL: IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS

A identificação rápida e precisa de patógenos é um componente essencial de vigilância biológica com benefícios para a saúde humana, assim como para as perspectivas em biodefesa, pois estes podem representar uma ameaça à segurança nacional de um país (ADALJA, 2018; ATLAS, 2002; DUNBAR *et al.*, 2018; FRANCIS *et al.*, 2013). Os sintomas iniciais de diversas doenças são não-específicos, é comum em infecções causadas por vários patógenos. Portanto, é importante a correta identificação dos patógenos, com potencial de risco biológico, para afirmar a possibilidade de ameaça à saúde ou bioterrorismo. Deste modo, é de interesse estratégico a capacidade de distinguir os casos de surtos naturais de microrganismos patogênicos daqueles que ocorrem por liberação de forma intencional (BUDOWLE *et al.*, 2005, 2011; CHUNG *et al.*, 2008; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2002).

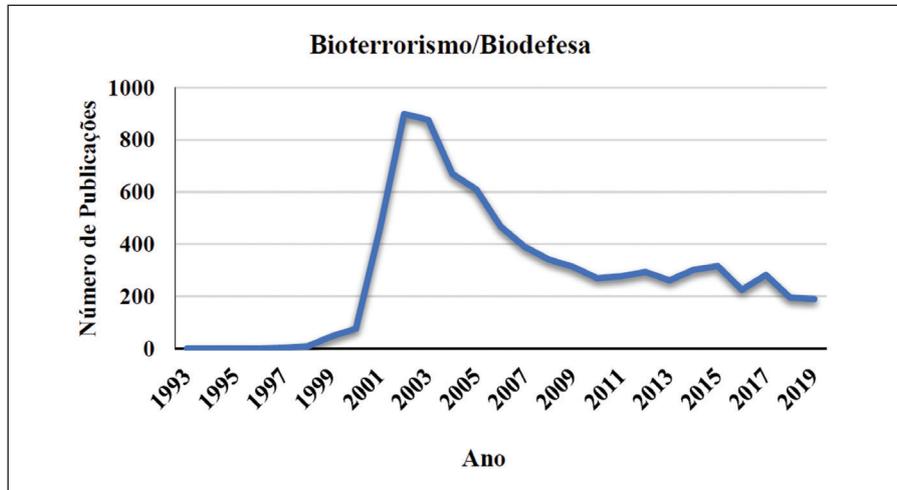
Apesar do avanço da tecnologia e facilidade de acesso aos agentes patogênicos ter aumentado com o passar dos anos, não é qualquer indivíduo que consiga manipular tais microrganismos para utilizar em um ataque bioterrorista. Grande parte desses agentes é de difícil produção em larga escala e precisam de laboratórios sofisticados para serem manipulados. Outro fator limitante é a variação da virulência entre os diferentes agentes. Em muitos casos a patogenicidade em questão depende da espécie ou até mesmo de cepas específicas difíceis de se obter, além de ser preciso conhecimento de um especialista para determinar se a espécie/cepa é a correta (BUDOWLE *et al.*, 2011).

A identificação rápida e precisa de patógenos é um componente essencial de vigilância biológica com benefícios para a saúde humana, assim como para as perspectivas em biodefesa, pois estes podem representar uma ameaça à segurança nacional (FRANCIS *et al.*, 2013).

Os sintomas iniciais de diversas doenças são comuns na infecção por vários patógenos. Portanto, a correta identificação dos patógenos com potencial de risco biológico é importante para afirmar a possibilidade de ameaça à saúde ou bioterrorismo. Deste modo, é de importância estratégica a capacidade de distinguir os casos de surtos naturais de microrganismos patogênicos daqueles que ocorrem por liberação de forma intencional (KHAN, 2011; KHAN; MORSE; LILLIBRIDGE, 2000; PINTO, 2013).

O número de pesquisas relacionadas ao bioterrorismo aumentou consideravelmente depois do ataque com esporos de *B anthracis* em 2001 nos EUA, como indicado no gráfico da Figura 1 com dados do PubMed/NCBI, indicando o crescente interesse em biodefesa dos países (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH – NCBI, 2019).

Figura 1. Número de publicações com os termos bioterrorism e/ou biodefesa.



Fonte: PubMed (NCBI), do ano 1993 – 2019.

6. TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE PATÓGENOS

As técnicas de detecção de microrganismos de interesse clínico ou para biodefesa devem ser das mais sensíveis e específicas o possível e sem que haja interferência de contaminantes externos, para não haver erro no diagnóstico. Além disso, é preferível que sejam por meio de equipamentos portáteis e de fácil operação, com resultado rápido e aplicável a diversas amostras e patógenos simultaneamente (MOORCHUNG; SHARMA; MEHTA, 2009). O ideal é que essas metodologias possam ser aplicadas em centros de referência, hospitais e clínicas que já logo após o processo de triagem de pacientes. A cultura de bactérias em meios específicos ou de vírus em tecidos ainda são considerados o padrão ouro entre os testes clínicos e laboratoriais na identificação dos agentes. Apesar disso, foram desenvolvidas técnicas que dão detalhes adicionais sobre os patógenos na investigação forense, como indicativos de sua fonte de origem e variações genéticas, por exemplo, obtidos através de ensaios envolvendo ácidos nucleicos (MORSE; BUDOWLE, 2006; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2002).

A interpretação dos resultados obtidos de ensaios de detecção baseados em alguns testes padronizados, comuns, para ácidos nucleicos nem sempre são o suficiente para se obter todas as informações de um caso de atentado bioterrorista e por isso, testes complementares podem ser essenciais. A combinação de técnicas pode ajudar a traçar a fonte de origem geográfica do ataque através de elementos físico ou químicos, o primeiro indivíduo contaminado ou infectado, assim como a forma que o patógeno ou toxina foi disseminado e quando a arma biológica foi preparada. Isso decorre do fato de que os microrganismos podem carregar informações que os relacionem com sua origem, como substâncias utilizadas no seu crescimento, reagentes químicos utilizados na produção, no caso das toxinas, por exemplo, além de nutrientes absorvidos do meio. Tais técnicas podem envolver cromatografia, espectrometria de massa, imunoenaios e a cultura de células (MORSE; BUDOWLE, 2006).

A amplificação de ácidos nucleicos se tornou um dos métodos mais utilizados na identificação rápida de agentes, por causa da sua sensibilidade e especificidade. Uma das formas



mais comuns na identificação de bactérias por meios moleculares é a técnica de PCR utilizando como alvo o gene ribossomal 16S (16S rRNA) (CHOL; WYSS; GÖBEL, 1996; CLARRIDGE; ALERTS, 2004; PETTI; POLAGE; SCHRECKENBERGER, 2005; SCHMALENBERGER; SCHWIEGER; TEBBE, 2001). Apesar disso, existe a necessidade de se ter testes complementares para dar mais confiança à identificação, evitando falsos positivos. As técnicas de PCR em tempo real (qPCR) tem basicamente os mesmos fatores limitantes e princípios da amplificação tradicional, sendo que as reações multiplex para qPCR tem se mostrado eficientes, porém as limitações encontradas são pela quantidade de fluoróforos disponíveis, adequação nas temperaturas da ciclagem, quantidades de reagentes e homologia entre as sequências dos iniciadores. A metodologia já foi testada para diversos agentes do bioterrorismo como *B. anthracis*, *E. coli*, vírus *Varíola major* (CLIFFORD *et al.*, 2012; DAMASO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013).

As técnicas de sequenciamento evoluíram significativamente durante o passar do tempo. Nos últimos 30 anos, o sequenciamento Sanger foi utilizado como método padrão para analisar moléculas de DNA. Apesar dos avanços contínuos como a introdução de sistemas de eletroforese capilar, bem como uma contínua diminuição dos custos, este método exigia uma alta demanda de tempo, além de ser caro, o que desencadeou a procura de métodos mais rápidos e acessíveis para sequenciamento de DNA em larga escala. Essa procura resultou no desenvolvimento de novas plataformas denominadas de Sequenciamento Paralelo Massivo (SPM) (BUDOWLE *et al.*, 2011; GOYA; IRMTRAUD; MARRA, 2012).

Nosso grupo já publicou vários trabalhos sobre a análise de microbiomas por SPM. Investigamos amostras de solo, rizoma e reservatórios de água, bem como a piscina de combustível nuclear de Angra II. Nestas investigações usamos a técnica de "fragmentação direta de DNA" para identificar espécies de bactérias e fungos que foram encontrados em diferentes biomas (FONSECA *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

Esta técnica de fragmentação de DNA (análise *Shotgun*) permite a análise direta e simultânea da metapopulação de microrganismos: arqueas, bactérias, fungos, vírus e protozoários. Entretanto, a detecção depende de uma concentração mínima de organismos para ser identificado (Figura 2A). Como alternativa, temos a amplificação de alvos genéticos específicos (análise *AmplicSeq*), em que investigamos sequências específicas de DNA, visando a identificação inequívoca do organismo em um pouco menos de 0,1 ng de DNA (Figura 2B). Em qualquer alternativa, a análise de bioinformática seria primordial para a confirmação do diagnóstico.

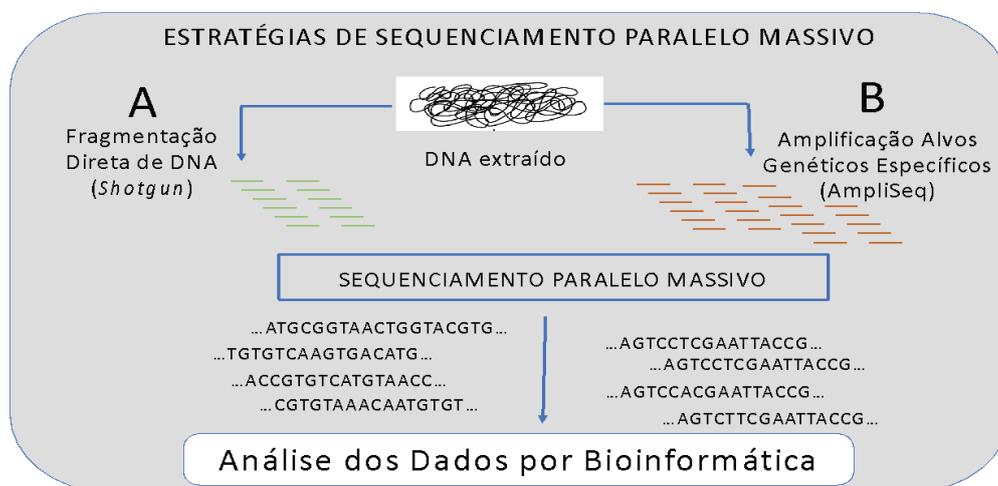


Figura 2. Diagrama das estratégias de sequenciamento paralelo massivo. **(A)** Fragmentação direta do DNA (*Shotgun*) e o sequenciamento de milhares de fragmentos. **(B)** Amplificação por PCR de alvos específicos (*AmplicSeq*), visando ser mais sensível e eficiente. Em qualquer caso, os resultados serão analisados por bioinformática para se obter a espécie da bactéria.

O desenvolvimento do SPM facilitou as análises microbiológicas, inclusive na área forense. Essa tecnologia pode gerar mais de 500 milhões de bases por reação, equivalente a uma grande quantidade de sequenciamentos paralelos. Por isso, uma mesma região do DNA é sequenciada várias vezes dando maior profundidade à área, possibilitando que uma amostra com muito menos DNA possa ser identificada (ANSORGE, 2009; BUDOWLE *et al.*, 2011; MINOGUE *et al.*, 2019; NOVOSSIOLOVA, 2017; OLIVEIRA; AMORIM, 2018).

Dentre as principais vantagens apresentadas com o uso das novas plataformas de sequenciamento em relação ao método de Sanger está a rapidez do processo de sequenciamento, já que procedimentos como clonagem não se fazem mais necessários. Além disso, os equipamentos de SPM podem gerar milhões de fragmentos ao mesmo tempo e processar diversas amostras simultaneamente. A tecnologia de SPM também possibilita identificar outros fatores contidos em determinada amostra, além do DNA do patógeno, como contaminantes com vestígios do meio de cultura utilizado para cultivo de um microrganismo em ataque intencional, pólen de plantas do local de origem e DNA do manipulador da amostra. Essas plataformas apresentam importantes aplicações na pesquisa de sequenciamento de genomas completos, identificação de mutações ou polimorfismos gênicos, metagenômica, doenças infecciosas, ecologia e genética forense (ANSORGE, 2009; BUDOWLE *et al.*, 2011; GILCHRIST *et al.*, 2015; GOYA; IRMTRAUD; MARRA, 2012; MINOGUE *et al.*, 2019; OLIVEIRA; AMORIM, 2018; ROTHBERG *et al.*, 2011).

Com as técnicas de SPM a bactéria não precisaria ser isolada em cultura, possibilitando identificar a fonte diretamente das amostras iniciais (BUDOWLE *et al.*, 2011; GILCHRIST *et al.*, 2015; MINOGUE *et al.*, 2019). Mesmo com a tecnologia SPM alguns fatores limitantes ainda são um problema nas análises forense. Quando a amostra contém grande quantidade de DNA exógeno, como em amostras de sangue ou amostras ambientais, por exemplo, a quantidade do DNA do patógeno alvo pode ficar comprometida. Para resolver isso, os métodos de separação precisam ser otimizados para separar os microrganismos de outras células (ADALJA, 2018; BUDOWLE *et al.*, 2011; KANE; SHAH; ALFARO, 2019).

7. CONCLUSÃO

No Brasil não há tantos casos relatados de bioterrorismo como em outros países como nos Estados Unidos e Japão, mas é importante que se tenha uma constante vigilância em relação aos agentes patogênicos, para que o governo e órgãos de saúde estejam preparados para ataques inesperados. Essa preocupação vem se intensificando, visto que o Brasil foi foco de atenção mundial de eventos como os Jogos Olímpicos e a Copa do Mundo. Além disso, recentes casos de doenças causadas pelos vírus Ebola, Zika e Chikungunya vem preocupando não só o Brasil, mas toda população mundial. Por isso, o Governo, através dos Sistemas de Saúde, já começou a procurar medidas para controlar a disseminação de doenças.

Assim como nos outros países, é de extrema importância que haja um investimento em pesquisa, desenvolvimento de tecnologia e infraestrutura por parte do governo, para que o país possa estar preparado para um possível ataque e o sistema de saúde e economia não entre em colapso.

Neste sentido nosso grupo, financiado pelo Programa CAPES Pró-Defesa, desenvolveu um painel genético para a detecção de 37 espécies de bactérias relevantes para o bioterrorismo e saúde pública utilizando a metodologia de amplificação multiplex e SPM, através da análise de 53 marcadores, 50 genes e três regiões do 16S rRNA. O ensaio do limite mínimo de detecção do SPM apresentou uma sensibilidade de 1.000 bactérias ou 70 pg de DNA. Utilizando a abordagem direta, sem amplificação por PCR, conseguimos detectar 5.000 bactérias. Para finalizar, estabelecemos um *pipeline*, com ferramentas livres, de filtragem de leituras por tamanho e qualidade, além do mapeamento nas referências de bancos de dados. Com tudo isso, podemos responder rapidamente, e com segurança, a pergunta-chave neste tipo de ataque: *este microrganismo possui potencial de dano à saúde pública?*



REFERÊNCIAS

- ADALJA, A. A. Biothreat Agents and Emerging Infectious Disease in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 823–834, 2018.
- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 195–203, 2009.
- ATLAS, R. M. Bioterrorism: From Threat to Reality. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 167–185, 2002.
- BACON, D. R. Biological Warfare: An Historical Perspective. **Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain**, v. 22, n. 4, p. 224–229, 2003.
- BUDOWLE, B. et al. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. **Critical reviews in microbiology**, v. 31, n. 4, p. 233–254, 2005.
- BUDOWLE, B. et al. *Microbial Forensics*, Second Edition. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Inc, 2011.
- CABRAL, B.C.A. et al. Planktonic microbial profiling in water samples from a Brazilian Amazonian reservoir. **MicrobiologyOpen**, v. 7, p. e523, 2018.
- CARDOSO, D. R.; CARDOSO, T. A. DE O. Bioterrorismo: dados de uma história recente de riscos e incertezas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. suppl 1, p. 821–830, 2011.
- CASHMAN, J. NATO Handbook on Medical Aspects of NBC Defensive Operations AMedP- 6 (B). *Emergency Response Handbook for Chemical and Biological Agents and Weapons, Second Edition*, n. July, p. 471–476, 2008.
- CHOL, B. K.; WYSS, C.; GÖBEL, U. B. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 1922–1925, 1996.
- CHRISTOPHER, L. G. W. Biological Warfare. **JAMA**, v. 278, n. 5, p. 412, 6 ago. 1997. Disponível em: <http://jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1997.03550050074036>.
- CHUGH, T. Bioterrorism: Clinical and public health aspects of anthrax. **Current Medicine Research and Practice**, v. 9, n. 3, p. 110–111, maio 2019.
- CHUNG, E. J. et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 3, p. 723–730, 2008.
- CLARRIDGE, J. E.; ALERTS, C. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.
- CLIFFORD, R. J. et al. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48558, 2012.
- DAMASO, C. R. A. et al. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 39–46, 2007.
- DANZIG, R.; PB, B. Why should we be concerned about biological warfare? **JAMA**, v. 278, n. 5, p. 431–432, 1997.
- DEFESANET, 2006. Disponível em: <https://www.defesanet.com.br/dqbrn/noticia/20725/AGROTERRORISMO-Petistas-Acusados-de-propagar-praga-do-Cacau/> Acesso em: 01 de julho de 2020.
- DUNBAR, J. et al. Perspective on improving environmental monitoring of biothreats. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 2018.
- FIORAVANTI, C.H., VELHO, L. Fungos, fazendeiros e cientistas em luta contra a vassoura-de-bruxa. **Sociologias**, Porto Alegre, ano 13, no 27, mai./ago. p. 256–283, 2011.
- FONSECA, J.H. et al. Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. **Gene**, v. 642, p. 389–397, 2018.
- FRANCIS, O. E. et al. Pathoscope : Species identification and strain attribution with unassembled sequencing data Pathoscope. **Genome Research**, v. 23, p. 1721–1729, 2013.
- FRISCHKNECH, F. The history of biological warfare. **EMBO Reports**, v. 4, p. 47–52, 2003.
- GILCHRIST, C. A. et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 541–563, 2015.
- GOYA, R.; IRMTRAUD, M. M.; MARRA, M. A. *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*. New York, NY: Springer New York, 2012.
- HARRIS, S. Japanese Biological Warfare Research on Humans: A Case Study of Microbiology and Ethics. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 21–52, 1942.
- HENDERSON, D. A. The Looming Threat of Bioterrorism. **Science**, v. 283, n. 5406, p. 1279–1282, 1999.

- INSTITUTE OF MEDICINE AND NATIONAL RESEARCH. BioWatch and Public Health Surveillance: Evaluating Systems for the Early Detection of Biological Threats: Abbreviated Version. Washington, DC: The National Academies Press, 2011. <https://www.nap.edu/catalog/12688/biowatch-and-public-health-surveillance-evaluating-systems-for-the-early>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- KANE, S. R.; SHAH, S. R.; ALFARO, T. M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 21–27, 2019.
- KHAN, A. S. Public health preparedness and response in the USA since 9/11: A national health security imperative. **The Lancet**, v. 378, n. 9794, p. 953–956, 2011.
- KHAN, A. S.; MORSE, S.; LILLIBRIDGE, S. Public-health preparedness for biological terrorism in the USA. **The Lancet**, v. 356, n. 9236, p. 1179–1182, 2000.
- MINOGUE, T. D. et al. Next-generation sequencing for biodefense: Biothreat detection, forensics, and the clinic. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 383–392, 2019.
- MOBLEY, C. O. L. J. A.; USAR, M. C. Biological Warfare in the Twentieth Century : Lessons from the Past , Challenges for the Future. **Military Medicine**, v. 160, p. 547–553, 1995.
- MOORCHUNG, N.; SHARMA, A. K.; MEHTA, S. R. Bioshock: Biotechnology and Bioterrorism. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 65, n. 4, p. 359–362, 2009.
- MORSE, S. A.; BUDOWLE, B. Microbial Forensics: Application to Bioterrorism Preparedness and Response. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 2, p. 455–473, 2006.
- NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. NIAID Strategic Plan for Biodefense Research, 2007. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/biosp2007.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- NIXDORFF, K. Biological Weapons Convention. Verifying Treaty Compliance. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 107–134.
- NOVOSSIOLOVA, T. Comparing responses to natural, accidental and deliberate biological events. **Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties**, v. 36, n. 2, p. 647–656, 2017.
- OLIVEIRA, M.; AMORIM, A. Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 24, p. 10377–10391, 2018.
- OSTERHOLM, M. T. Bioterrorism : A Real Modern Threat. In: SHELD, W. M.; CRAIG, W. A.; HUGHES, J. M. (Org.). . Emerging infections 5. Washington, D.C.: ASM Press, 2001 . p. 213–222.
- PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6123–6125, 2005.
- PINTO, V. N. Bioterrorism: Health sector alertness. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 24–28, 2013.
- ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348–352, 2011.
- SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3557–3563, 2001.
- SILVA, L. J. DA. Guerra biológica, bioterrorismo e saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1519–1523, 2001.
- SILVA, R. et. al. Microbial enrichment and gene functional categories revealed on the walls of a spent fuel pool of a nuclear power plant . **PlosOne** v. 13, n. 10, p. e0205228, 2018.
- TOROK, T. J. A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. **JAMA**, v. 278, n. 5, p. 389–395, 1997.
- VALDIVIA-GRANDA, W. A. Biodefense Oriented Genomic-Based Pathogen Classification Systems: Challenges and Opportunities. **Journal of Bioterrorism & Biodefense**, v. 03, n. 01, p. 1–20, 2012.
- WALSH, M. G.; MOR, S. M.; HOSSAIN, S. The elephant–livestock interface modulates anthrax suitability in India. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1898, p. 20190179, 2019.
- WHEELIS, M. Biological Warfare at the 1346 Siege of Caffa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 971–975, set. 2002.
- WHO. Laboratory biosafety manual. 3rd. ed. [S.l.: s.n.], 2004. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9241546506>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- ZHANG, W. et al. Quick identification and quantification of *Proteus mirabilis* by polymerase chain reaction (PCR) assays. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 683–689, 2013.