

Elisabete Manuela de Sousa Ramos

Sistemas Multiplex para a deteção e caracterização Molecular de Infeções

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2012

Elisabete Manuela de Sousa Ramos

Sistemas Multiplex para a deteção e caracterização Molecular de Infeções

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2012

© 2012
Elisabete Manuela de Sousa Ramos
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS
Elisabete Manuela de Sousa Ramos

Sistemas Multiplex para a deteção e caracterização Molecular de Infeções

Assinatura
Elisabete Manuela de Sousa Ramos

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda

Resumo

Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização Molecular de Infecções

Atualmente existe uma enorme preocupação em estudar os microrganismos, em particular os patogênicos para o Homem, uma vez que a sua presença no organismo constitui um risco potencial para a saúde Humana. Por este motivo, nos últimos 10-20 anos, temos assistido a uma evolução significativa nas técnicas disponíveis para a identificação laboratorial dos agentes responsáveis por patologias de base infecciosa.

Os novos métodos, especialmente os baseados na tecnologia dos ácidos nucleicos, apresentam enormes vantagens em termos de sensibilidade, especificidade e grande rapidez na obtenção de resultados. Por este motivo, têm sido cada vez mais utilizados na detecção e identificação de microrganismos com interesse diagnóstico, prognóstico e de orientação do tratamento.

Diversas tecnologias moleculares são utilizadas em laboratório para detetar agentes patogênicos. As mais utilizadas dependem de plataformas de PCR, e mais recentemente de PCR-em-tempo-real, disponibilizando sensibilidade, especificidade e rapidez sem precedentes na história da microbiologia e virologia clínica. No entanto a elevada especificidade destas técnicas podem também constituir uma desvantagem em situações clínicas que possam ter etiologias associadas a um largo espectro de microrganismos. Por este motivo têm sido desenvolvidas estratégias moleculares para detetar simultaneamente múltiplos agentes: os designados Sistemas Multiplex.

O primeiro destes sistemas a ser desenvolvido foi o PCR Multiplex o qual permite detetar e amplificar simultaneamente mais do que um organismo identificando assim o agente etiológico. Mais recentemente têm sido desenvolvidos outros métodos multiplex com o mesmo fim: Técnicas baseadas em Microchips (de hibridização ou de amplificação as quais permitem a detecção e identificação de até milhares de sequências e consequentemente centenas a milhares de agentes patogênicos em simultâneo) bem como sistemas baseados na tecnologia X-Map (fusão da citometria de fluxo e hibridização em solução com partículas fluorescentes). Do mesmo modo, os sistemas baseados na amplificação e sequenciação do gene rRNA 16S permitem a detecção e identificação de praticamente qualquer bactéria patogénica, sem necessitar de qualquer suspeita prévia.

Finalmente, o advento das técnicas de sequenciação de 2ª e 3ª geração permitiu o desenvolvimento de uma nova área científica: a Metagenómica, a qual procura caracterizar simultaneamente e completamente a composição microbiológica de ecossistemas complexos, sejam eles humanos (pele, urina, fezes, boca, etc) ou ambientais (ar, águas residuais, solo, etc).

Palavras-chave: agentes patogênicos, PCR-em-tempo-real, PCR Multiplex, Microchips, X-Map, Sequenciação, Sistemas Multiplex.

Abstract

Multiplex systems for the detection and molecular characterization of infections

Currently, a great deal of effort is being put into the study of microorganisms, particularly pathogenic ones, since their presence in the human body poses a great deal of serious threats to human health. For this reason, in the past 10-20 years, a significant evolution has occurred in the available methods for Pathology associated microorganism detection and characterization.

The newly available methods, particularly the molecular based ones present huge advantages in terms of sensitivity, specificity and speed of result availability. For this reason their use in the clinical diagnosis, prognosis or treatment guidance setting has dramatically increased in recent years.

Various technologies are used in the lab for the molecular detection of pathogens. The most used ones depend on PCR platforms or more recently, on Real-time-PCR technologies, and provide sensitivities, specificities and speed of results without parallel in the history of clinical microbiology and virology. However, the enormous specificity of these techniques may also prove problematic in clinical settings whose etiology may be associated with a broad range of microorganisms. For this reason, molecular strategies have been developed for the simultaneous detection of several agents: the so called multiplex assays.

The first of the multiplex assays being developed was the multiplex PCR, allowing the amplification and detection of several microorganisms, thus providing a more broad identification of pathology associated microorganisms. More recently other multiplex assays have been developed with the same goal in view, but with an even broader range of microorganisms as targets: techniques based on microchips (either hybridization or amplification based, and allowing the detection and identification of up to thousands of different microorganisms) and the X-MAP based systems (a fusion of the cytometry and fluid based fluorescent-bead associated hybridization techniques). Also, assays based on the sequencing of universal genes such as the 16S rRNA gene allows the detection and identification of virtually any bacteria (pathogenic or not).

Finally, the advent of 2nd and 3rd generation sequencing techniques has allowed the development of a new science area (Metagenomics), which aims at the full and simultaneous characterization of complete complex microbiological ecosystems such as the ones found in the Human body (urine, stool, mouth, skin, etc) or in the environment (air, residual waters, soil, etc).

Keywords: pathogen agents, Real-Time PCR, Multiplex PCR, Microchips, X-Map, Sequencing, Multiplex Systems.

Dedicatória

Às meus pais

À minha irmã

Às meus avós

Agradecimentos

À Universidade Fernando Pessoa e ao núcleo de docentes que a integra, pela excelente qualidade de ensino que proporcionam aos alunos.

Ao Professor Doutor José Cabeda, meu orientador, pela dedicação, empenho, paciência, disponibilidade e pela confiança que sempre depositou em mim e que esteve sempre presente no decorrer deste projeto. Agradeço-lhe pelo auxílio e por todo o saber e conhecimento que sempre partilhou comigo generosamente.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e incentivo incondicionais e por acreditarem em mim.

Ao Luís, pelo carinho e compreensão que sempre me dedicou ao longo deste percurso.

Os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização do meu curso.

ÍNDICE GERAL

SUMÁRIO

ABSTRACT

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Parte I - Introdução	1
1. Infecções	2
1.1. Perspetiva histórica	2
1.2. Tipos de Agentes Patogénicos	3
1.2.1. Infecções Bacterianas	4
1.2.2. Infecções Virais	5
1.2.3. Infecções Fúngicas	6
1.3. Métodos de Diagnóstico	7
1.3.1. Métodos Microbiológicos Clássicos	8
1.3.2. Biologia Molecular	8
1.3.2.1. Desafios a Satisfazer	9
Parte II	10
Métodos moleculares para deteção e caracterização de microrganismos	10
2. Métodos moleculares tradicionais	11
2.1. Métodos baseados na Hibridização	11
2.1.1. Southern Blot	12
2.1.2. Dot-blot	12
2.2. Métodos baseados na conformação dos ácidos nucleicos	13
2.2.1. SSCP – Single Strand Conformation Polimorphism	13
2.2.2. Análise de Heterodupletos (HA)	14
2.2.3. CSGE – Conformation Sensitive Gel Electrophoresis	15
2.3. Métodos baseados na Temperatura de Melting dos A.N	16
2.3.1. DHPLC – Denaturing High-Performance Liquid Chromatography	16
2.3.2. DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	17
2.3.3. CDGE – Constant Denaturing Gel Electrophoresis	18
2.3.4. TTGE – Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis	18
3. Técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos	19
3.1. Técnicas baseadas no PCR	19
3.1.1. PCR	19
3.1.2. RT-PCR	21
3.1.3. Nested-PCR	21
3.1.4. qPCR	22

3.2.	Strand Displacement Amplification (SDA)	22
3.3.	Nucleic Acid Based Amplification (NASBA) / Transcript Mediated Amplification (TMA)	23
3.4.	Ligase Chain Reaction (LCR)	24
4.	Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização de microrganismos	25
4.1.	PCR Multiplex	25
4.2.	Microchips	26
4.3.	Mass-Tag	27
4.4.	Luminex/xMAP	28
4.5.	Sequenciação	30
4.5.1.	Sequenciação de 1ª geração	30
4.5.1.1.	Sequenciação de Sanger	30
4.5.1.2.	Pirosequenciação	31
4.5.2.	Sequenciação de 2ª geração	32
4.5.2.1.	Pirosequenciação (GS-FLX – Roche)	32
4.5.2.2.	SOLID	34
4.5.2.3.	Illumina	35
4.5.3.	Sequenciação de 3ª geração	37
4.5.3.1.	Pacific Biosciences SMRT	38
4.5.3.2.	Helicos (Heliscope Sequencing)	38
4.5.3.3.	Ion Proton	39
4.5.3.4.	Nanopore sequencing	40
4.5.4.	Aplicações da Sequenciação à detecção e caracterização de genomas	41
4.5.4.1.	Sequenciação do gene rRNA 16S	41
4.5.4.2.	DNA Barcoding	43
4.5.4.3.	Metagenômica	43
	Parte III - Conclusão	45
	5. Conclusão	46
	Parte IV - Bibliografia	48
	6. Bibliografia	49

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da reação de polimerase em cadeia – PCR. a) Desnaturação. b) Annealing ou Hibridização. c) Extensão das cadeias. d) Duplicação do número de cadeias de DNA.....	20
Figura 2. Esquema representativo do funcionamento da reação de polimerase em cadeia – PCR. a) PCR normal. b) PCR Multiplex.	26
Figura 3. Esquema ilustrativo dos diferentes chips de DNA das várias tecnologias.....	27
Figura 4. Esquema representativo da tecnologia Luminex/XMap e seus componentes.	29
Figura 5. (A) Esquema representativo do funcionamento do sistema de sequenciação GS. (I) Construção da “biblioteca” e ligação aos adaptadores (II) formação de gotículas, seguindo-se uma reação de PCR em emulsão. (III) As esferas encaixam perfeitamente nos poços. (B) Esquema ilustrativo da reação de pirosequenciação.....	33
Figura 6. Esquema representativo do sistema SOLiD. (a) Esquema indicando a sucessão de primers e ciclos de sequenciação. (b) Esquema indicando a interpretação sucessiva do código de cores e sequências de nucleótidos.	35
Figura 7. Esquema representativo da plataforma Solexa. I) Fragmentação e ligação aos adaptadores. II) Amplificação “bridge” utilizando os primers ligados ao suporte sólido e os adaptadores do fragmento de DNA. III) Sequenciação dos fragmentos de DNA.	37
Figura 8. Sequenciador de sílica. Ion Torrent chip que descodifica o DNA através da deteção da alteração da voltagem.....	39
Figura 9. Representação do sistema MinION. Dispositivo sequenciador de DNA do tamanho de uma pen USB portátil e descartável.	41
Figura 10. Esquema representativo da árvore filogenética universal com base na comparação das sequências do gene 16S rRNA.....	42

Lista de Abreviaturas

A.N - ácido nucleico

ATP - adenosina trifosfato

CCD – charge-coupled device

CDGE - Constant Denaturing Gel Electrophoresis

cDNA - DNA complementar

COI - citocromo c oxidase I

CSGE - Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

dATP - deoxinucleótido de adenina trifosfatada

dCTP - deoxinucleótido de citosina trifosfatada

ddATP - dideoxinucleótidos de adenosina trifosfatada

ddCTP – dideoxinucleótido de citosina trifosfatada

ddGTP – dideoxinucleótido de guanina trifosfatada

ddNTPs - trifosfatos de dideoxinucleótidos

ddTTP – dideoxinucleótido de timina trifosfatada

DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

dGTP – deoxinucleótido de guanina trifosfatada

DHPLC - Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - trifosfatos de deoxinucleótidos

dTTP – deoxinucleótido de timina trifosfatada

Gb - giga bases

HA - Análise de Heterodupletos

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPA - Hybridization Protection Assay

LCR - Ligase Chain Reaction

mRNA - RNA mensageiro

NASBA - Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

pb - pares de bases

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PPi - pirofosfato libertado

qPCR – real-time PCR

RNA - ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

rRNA - RNA ribossomal

RT - transcriptase reversa

RT-PCR - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SDA - Strand Displacement Amplification

SMRT - Single Molecule Real Time

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism

ssDNA - single strand DNA

ssRNA - single strand RNA

TAS - Sistema de Amplificação por Transcrição

Tm - Temperatura de melting ou de fusão

TMA - Transcript Mediated Amplification

TTGE - Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

ZMW - Zero-mode waveguides

PARTE I - INTRODUÇÃO

1. Infecções

1.1. Perspetiva histórica

A ciência da Microbiologia nasceu com Pasteur e dela divergiram outras áreas científicas, como a Genética, a Biotecnologia e a Imunologia. A Microbiologia é uma ciência com caráter pluridisciplinar, que outrora Sedillot e Pasteur designaram como a ciência dos microrganismos unicelulares microscópicos, que surgiu com as primeiras observações de seres com dimensões realmente microscópicas. A sua designação deriva de três palavras: *mikros* (pequeno), *bios* (vida) e *logos* (ciência) (Ferreira & Sousa, 1998).

As observações do holandês, mercador de tecidos, Antony van Leeuwenhoek, que nessa época já utilizava lentes para observar as fibras dos seus tecidos foram de extrema relevância para o desabrochar da Microbiologia. Ao longo da sua vida Leeuwenhoek construiu mais de 250 microscópios e pela primeira vez conseguiu visualizar microrganismos da saliva, da água e das fezes designando-os de “animáculos” (Ferreira & Sousa, 1998).

Nessa época imperava a ideia da geração espontânea, que defendia a teoria que partindo de matéria inerte em decomposição se originava vida de uma forma espontânea.

Louis Pasteur, considerado o génio da Microbiologia, veio demonstrar com o desenvolvimento das suas experiências que não era possível o aparecimento de microrganismos de uma forma espontânea descreditando assim a teoria da geração espontânea. Pasteur deixou assim a sua marca e tentou desenvolver métodos para compreender as causas das doenças infecciosas (Ferreira & Sousa, 1998).

É de salientar outros trabalhos desenvolvidos por alguns estudiosos da época, que vieram dar o seu contributo para o desenvolvimento da Microbiologia, como é o caso de John Tyndall, um físico, e Ferdinand Cohn, que com as suas investigações e experiências levaram a pensar na possibilidade da existência de formas termorresistentes designadas, mais tarde, por esporos (Fernandes *et al.*, 2010).

Também Joseph Lister, entre muitos outros, tentaram demonstrar que os microrganismos eram capazes de provocar doenças, transmitindo-se de indivíduos portadores a indivíduos saudáveis (Fernandes *et al.*, 2010).

Robert Koch, que também ocupa um lugar de peso na Microbiologia, desenvolveu os tão conhecidos Postulados de Koch, os quais ainda hoje são utilizados para definir a origem infecciosa de uma patologia (Fernandes *et al.*, 2010).

Mais tarde, em 1953, surge Watson e Crick que descobrem a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico), fazendo assim nascer a Biologia Molecular e a Genética Molecular, as quais se aplicam também ao estudo de microrganismos (Fernandes *et al.*, 2010).

1.2. Tipos de Agentes Patogénicos

Existem vários tipos de microrganismos altamente virulentos denominados de agentes patogénicos, que são responsáveis pelo aparecimento de determinadas doenças infecciosas no Homem. Dentro do vasto leque de agentes considerados patogénicos podemos encontrar bactérias, fungos e vírus, considerados como os principais tipos de patogénicos (Fernandes *et al.*, 2010).

Os microrganismos que causam doença infecciosa em indivíduos imunodeprimidos são classificados de patogénicos oportunistas.

Muitos destes microrganismos podem adaptar-se ao hospedeiro desenvolvendo resistências aos seus mecanismos de defesa. Um exemplo desta adaptação são as bactérias que produzem macromoléculas causadoras de inflamação, aderência aos tecidos e até mesmo toxinas que alterando o metabolismo do hospedeiro estão na origem de patologias específicas (Fernandes *et al.*, 2010).

Por outro lado os fungos normalmente não causam doença em indivíduos imunocompetentes. Geralmente ocorre a doença quando acidentalmente estes atravessam algum tipo de barreira que os faça penetrar no hospedeiro, permitindo o seu crescimento (Fernandes *et al.*, 2010).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que contêm apenas um único ácido nucleico (RNA ou DNA) e podem infetar todas as formas de vida.

Um conhecimento mais aprofundado acerca destes patogénicos é crucial para o estabelecimento de um rápido e correto diagnóstico clínico (Fernandes *et al.*, 2010).

1.2.1. Infecções Bacterianas

Inúmeras espécies bacterianas habitam o Organismo Humano de forma comensal, ou seja, não só não provocam qualquer tipo de dano no organismo, como, pelo contrário desempenham um importante necessário e benéfico papel para o Homem (Ferreira & Sousa, 1998). Em contrapartida, estes organismos podem ser suscetíveis de causar doença caso não se verifiquem as condições favoráveis e necessárias para que as bactérias possam exercer o seu papel benéfico no hospedeiro, designando-se neste caso por agentes patogénicos (Ferreira & Sousa, 1998). O termo infeção é utilizado quando um determinado microrganismo se instala num hospedeiro e é capaz de provocar doença. Quando a infeção produz sintomas é denominada doença infecciosa (Ferreira & Sousa, 1998).

Os agentes patogénicos podem subdividir-se em agentes patogénicos primários, quando infetam indivíduos saudáveis e agentes patogénicos oportunistas, se conseguirem apenas infetar determinados indivíduos afetados previamente por patologia, que reduz a sua capacidade de combater a infeção oportunista (Ferreira & Sousa, 1998).

As infeções de etiologia bacteriana são muito variadas. Determinadas espécies de bactérias são capazes de provocar doença sem que haja invasão dos tecidos, permanecendo associadas a mucosas (*V. cholerae*), outras podem simplesmente invadir os tecidos de uma forma mais superficial (*H. pylori*) ou podem também disseminar-se nos tecidos (*Salmonella*) (Fernandes *et al.*, 2010).

Enquanto agentes patogénicos, as bactérias podem replicar-se fora das células nos tecidos e aí são denominadas como agentes patogénicos extracelulares, ou podem comportar-se como agentes patogénicos intracelulares quando o fenómeno de replicação ocorre dentro de células. Nestes locais a replicação pode ser rápida, podendo também causar infeções persistentes (Ferreira *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos métodos baseados na tecnologia dos ácidos nucleicos veio permitir uma maior rapidez e especificidade na deteção e identificação de agentes patogénicos nomeadamente as bactérias, contribuindo assim para um rápido diagnóstico e conseqüente tratamento das infeções causadas por este tipo de agente causador da infeção. (Mothershed & Whitney, 2005).

1.2.2. Infeções Virais

Os vírus representam entidades potencialmente patogénicas, cuja informação genética está contida num único tipo de ácido nucleico (ácido ribonucleico ou ácido desoxirribonucleico) mas nunca em ambos (Ferreira & Sousa, 1998).

Os vírus caracterizam-se como entidades microscópicas, intracelulares obrigatórias, que para se replicarem necessitam indispensavelmente de uma célula viva. Uma vez no interior da célula hospedeira, estes agentes utilizam a maquinaria bioquímica da célula infetada provocando a síntese de partículas podendo assim transferir o seu genoma para outras células. Este fenómeno pode ser designado como parasitismo a nível genético (Ferreira & Sousa, 1998).

Outra característica essencial dos vírus aponta para uma fase extracelular, sob a forma de partículas inertes, geradas pela própria célula, que vão funcionar como veículo para a introdução da informação genética do vírus em questão em novas células. Com vista a ultrapassar as barreiras de defesa das células hospedeiras, os vírus foram desenvolvendo mecanismos específicos de modo a conseguir penetrar e a adaptar-se nas células que infetam (Ferreira & Sousa, 1998).

Deste modo é fácil entender que o primeiro passo para que ocorra infeção viral se inicia por contacto com um hospedeiro. O contacto com o hospedeiro pode ocorrer através de várias vias de transmissão viral, como por exemplo o contacto sexual, transfusões, material médico, via fecal-oral, aerossóis respiratórios, fomitos entre outras. (Ferreira & Sousa, 1998).

1.2.3. Infecções Fúngicas

Durante muitos anos, os cogumelos foram os únicos fungos conhecidos e observados microscopicamente por Antony van Leeuwenhoek. (Ferreira *et al.*, 2010).

Mais tarde surge o termo Micologia, que é hoje definido como a ciência que estuda os fungos. Atualmente existe um ramo da Micologia, que se dedica ao estudo de fungos patogênicos que como o próprio nome indica, trata-se de fungos que são capazes de provocar doença no Homem ou no animal (Ferreira *et al.*, 2010).

Tal como se verifica com as bactérias, os fungos também podem possuir um caráter benéfico ou prejudicial para o Homem. Estes microrganismos são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo com alguns nutrientes da biosfera, o seu forte poder patogénico é muito importante especialmente nos vegetais uma vez que são responsáveis por muitos prejuízos económicos (Ferreira *et al.*, 2010).

Em contrapartida, a nível industrial, os fungos são extremamente úteis e necessários para variados processos de fabrico de pão, vinhos, cervejas e alguns tipos de queijos (Ferreira *et al.*, 2010).

Também do ponto de vista farmacológico, estes microrganismos são muito utilizados na produção de alguns fármacos, como a cortisona, na produção de ácidos orgânicos, na produção de alguns antibióticos, como a penicilina e de substâncias imunossupressoras, como a ciclosporina (Ferreira *et al.*, 2010).

De um modo geral estes organismos são saprófitas. Desenvolvem-se à superfície de células vivas ou a partir de matéria orgânica morta, sem causar qualquer tipo de dano. Outros são denominados como fungos parasitas, que se desenvolvem à custa de outro organismo vivo, provocando-lhe lesões, sendo portanto prejudiciais, como é o exemplo do *Blastomyces dermatitidis*, que causa lesões graves na pele. Existem ainda os fungos simbiotes que são aqueles que vivem em associação com outro organismo vivo, como é o caso dos líquenes, em que ambos beneficiam dessa associação (Ferreira *et al.*, 2010).

Estes fungos patogênicos podem aceder ao nosso organismo através de diferentes mecanismos de entrada. Podem ser inoculados por vetores invertebrados no seu hospedeiro, como no caso do protozoário *Plasmodium* cujo vetor é o mosquito *Anopheles*, que quando inoculado provoca a malária. Outros podem aceder ao

hospedeiro por ingestão de alimentos contaminados por formas resistentes, como no caso da *Entamoeba* (Ferreira *et al.*, 2010).

1.3.Métodos de Diagnóstico

Em 1677 Antony van Leeuwenhoek deu início à identificação e caracterização fenotípica de microrganismos, através das suas observações microscópicas.

Mais tarde Robert Koch introduziu os primeiros meios de cultura sólidos, permitindo assim a identificação e diferenciação de bactérias. (Ferreira & Sousa, 2000).

Com o avanço da ciência, foram desenvolvidas e utilizadas no diagnóstico as técnicas imuno-serológicas e posteriormente as bem mais complexas técnicas de biologia molecular como por exemplo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Ferreira & Sousa, 2000).

Atualmente existem métodos moleculares e imunológicos que rapidamente e com elevada especificidade permitem identificar as diferentes espécies e estirpes de microrganismos (Ferreira & Sousa, 2000).

As técnicas de biologia molecular, e em particular as que envolvem a amplificação de genes são cada vez mais utilizadas como meio de diagnóstico em microbiologia, permitindo a rápida, sensível e muito específica identificação de microrganismos, bem como a avaliação das resistências a determinados grupos de antibióticos (Visser & Fluit, 1995).

Os métodos de sequenciação dos ácidos nucleicos também vieram dar o seu contributo em diversas áreas da microbiologia, permitindo uma maior rapidez e especificidade dos resultados, quando comparados com os métodos clássicos (Ferreira & Sousa, 2000).

1.3.1. Métodos Microbiológicos Clássicos

A metodologia clássica usada para a identificação dos microrganismos baseia-se sobretudo na observação morfológica, efetuada diretamente no produto biológico ou através das sequências genómicas para detetar antigénios (Fernandes *et al.*, 2010).

Pode também recorrer-se a métodos de caracterização bioquímica, antigénica e genotípica do agente, nos casos em que o microrganismo sofreu multiplicação (Fernandes *et al.*, 2010).

O microscópio ótico é, por excelência, o exemplo da ferramenta clássica em microbiologia. Persiste ainda hoje como a ferramenta mais usada para a visualização direta de bactérias, fungos e parasitas (Fernandes *et al.*, 2010).

A óbvia exceção são os vírus que, devido às suas dimensões e características só podem ser visualizados através de microscopia eletrónica (Fernandes *et al.*, 2010).

A deteção de antigénios específicos presentes num determinado microrganismo pode ser realizada através de reações antigénio/anticorpo, podendo recorrer-se a várias técnicas, como por exemplo reação de aglutinação, ensaios imunoenzimáticos e imunofluorescência. (Fernandes *et al.*, 2010).

1.3.2. Biologia Molecular

Hoje em dia são cada vez mais utilizadas as técnicas de biologia molecular, no diagnóstico direto, já que, apesar de apresentarem custos mais elevados, compensam na rapidez e especificidade dos resultados (Mothershed & Whitney, 2005).

Através dos métodos de biologia molecular baseados nos ácidos nucleicos é possível detetar, identificar e caracterizar diferentes microrganismos. (Ferreira & Sousa, 2000).

Com a evolução da tecnologia, foi possível detetar e analisar os ácidos nucleicos diretamente sem amplificação utilizando técnicas como a hibridação com sondas e a amplificação de sinal pela técnica do DNA ramificado (que entretanto foi ultrapassada pela PCR-em-tempo-real) (Ferreira & Sousa, 2000).

Os ácidos nucleicos podem também ser detetados diretamente após amplificação de sinal através de sistemas de amplificação de sondas e sistemas de amplificação específicos de alvo (Ferreira & Sousa, 2000).

Os sistemas de amplificação de sondas incluem a reação de ligação em cadeia (LCR) e a reação de amplificação pela Q β replicase (Ferreira & Sousa, 2000).

Por outro lado, os sistemas de amplificação específicos de alvo englobam a reação de polimerização em cadeia (PCR), a amplificação com remoção de cadeia (SDA), e os sistemas de amplificação baseados em reações de transcrição, que permitem a amplificação direta e específica do RNA alvo (Ferreira & Sousa, 2000).

1.3.2.1. Desafios a Satisfazer

Com a descoberta da biologia molecular e com o desenvolvimento das metodologias associadas a esta vasta área procurou-se ultrapassar vários obstáculos relativamente ao que acontecia com as técnicas tradicionais.

Procura-se assim obter resultados mais rápidos e precisos, uma maior especificidade na deteção de microrganismos a nível hospitalar, já que uma rápida deteção do agente patogénico implica um tratamento mais rápido e eficaz. Também na indústria alimentar, os métodos moleculares são indispensáveis no controlo da qualidade dos alimentos, bem como no controlo de doenças infecciosas (Mothershed & Whitney, 2005).

PARTE II

**MÉTODOS MOLECULARES PARA
DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROORGANISMOS**

2. Métodos moleculares tradicionais

2.1. Métodos baseados na Hibridização

A técnica de hibridização (ou hibridação) depende sobretudo da associação entre duas cadeias polinucleotídicas. Este fenómeno de associação por complementaridade de bases pode ocorrer entre cadeias de DNA, entre cadeias de RNA e até entre combinações de DNA e RNA, desde que exista complementaridade de bases entre ambas as cadeias (Cabeda *et al.*, 2012).

Várias técnicas baseadas na hibridização foram desenvolvidas ao longo dos anos e são cada vez mais utilizadas no âmbito da biologia molecular. Permitem verificar se determinadas sequências ocorrem no DNA de um organismo, demonstrar a relação evolutiva e genética entre organismos distintos, determinar e quantificar os genes transcritos num mRNA (RNA mensageiro) específico, e localizar uma determinada sequência de DNA complementar de um oligonucleotídeo (sonda) (Ferreira & Sousa, 2000).

As sondas, geralmente são limitadas a 15-30 nucleótidos (sondas oligonucleotídicas), mas também podem conter centenas de nucleótidos (sondas intragénicas) (Ferreira & Sousa, 2000).

As sondas são marcadas especificamente para detetar com maior facilidade um híbrido. Se a sonda for marcada com um isótopo radioativo, o híbrido formado é detetado através da emissão da radiação. Pode também ser detetado pelo aparecimento de coloração, quando a sonda é marcada com uma enzima que atua sobre um substrato cromogénico. Se a sonda for marcada com um fluorocromo visualiza-se a emissão de fluorescência ou ainda pela emissão de luz, se a sonda for marcada com uma enzima que atua sobre um substrato luminescente (Ferreira & Sousa, 2000).

É de salientar que sondas de DNA ou de RNA têm sido bastante úteis no que respeita à deteção de ácidos nucleicos *in situ*, possibilitando o fornecimento de informação quanto à distribuição de microrganismos quer a nível celular, dos tecidos ou até mesmo no ambiente (Ferreira & Sousa, 2000).

Os métodos mais comuns de hibridização em fase sólida são o Southern blot e o Dot-blot, que irão ser descritos a seguir (Ferreira & Sousa, 2000).

2.1.1. Southern Blot

O Southern Blotting consiste na transferência de fragmentos de DNA, (depois de separados em função do seu peso molecular num gel de eletroforese) para um suporte de membrana (Brown, 2003).

Na técnica de Southern blot, os fragmentos são produzidos com recurso a enzimas de restrição, cuja função é cortar a dupla cadeia de DNA em função da sequência do DNA.

Os fragmentos de DNA obtidos são separados consoante o seu tamanho através do processo de eletroforese em gel de agarose, por meio de uma corrente elétrica. Os fragmentos que apresentam dimensões menores migram em primeiro lugar (Ferreira & Sousa, 2000).

Os fragmentos resultantes podem sofrer desnaturação e ser transferidos (blotting) para uma membrana de nylon ou de nitrocelulose. Os fragmentos fixam-se de forma estável à membrana e permanecem nas mesmas posições em que se encontravam no gel. Uma vez fixo na membrana do gel, o DNA pode então ser analisado (Cabeda *et al.*, 2012).

A identificação das sequências genómicas é feita através de sondas, constituídas por sequências nucleotídicas complementares das sequências específicas que queremos encontrar. Na presença da sequência desejada ocorre a hibridização com a sonda (Cabeda *et al.*, 2012).

2.1.2. Dot-blot

O Dot-blot é uma variante da técnica de Southern blot em que o DNA alvo é aplicado diretamente sobre a membrana de nitrocelulose ou nylon sendo de seguida hibridizado com uma sonda.

A diferença principal entre o Dot-blot e o Southern blot consiste na separação eletroforética que ocorre no Southern blot, mas que não se verifica no Dot-blot.

O método de Dot-blot é utilizado para determinar de uma forma rápida, as concentrações relativas dos ácidos nucleicos numa mistura (Kafatos *et al.*, 1979).

O Dot-blot é portanto um método muito utilizado em ensaios em que se procura analisar a quantidade de produto obtido, sem que seja necessário obter qualquer informação quanto ao peso molecular e número de espécies de DNA obtidas no sinal (Cabeda *et al.*, 2012).

Uma variação da técnica de Dot-blot é o Slot-blot. Existe uma diferença entre estas duas técnicas que consiste na origem do sinal de hibridização. No Dot-blot o DNA é aplicado numa fenda em círculo originando um sinal circular. No Slot-blot o DNA é aplicado numa fenda retangular, em que uma das dimensões é muito reduzida, originando um sinal tipo banda. Assim a quantificação do sinal originado pelo slot-blot é mais fácil, fiável e reproduzível (Cabeda *et al.*, 2012).

2.2. Métodos baseados na conformação dos ácidos nucleicos

2.2.1. SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism

SSCP é uma das técnicas utilizadas para identificar sequências que sofreram mutação ou detetar polimorfismos de genes conhecidos. Trata-se de uma técnica genética de rastreio, que permite uma rápida deteção de substituições de uma base em fragmentos de DNA, amplificados pela técnica de PCR (Albuquerque & Costa, 2003).

O princípio da análise por SSCP baseia-se no facto da cadeia simples de DNA possuir uma conformação definida. Esta conformação vai ser alterada devido a uma mudança de uma única base na sequência de DNA, podendo originar uma migração diferencial da ssDNA (single strand DNA), sob condições não desnaturantes, no gel de eletroforese (Albuquerque & Costa, 2003).

Como tal, as amostras de DNA do tipo mutante e do tipo selvagem (wild-type) vão exibir diferentes padrões de bandas, no processo eletroforético (Albuquerque & Costa, 2003).

A Single Strand Conformation Polymorphism realiza-se com as seguintes etapas: 1) amplificação das sequências do DNA de interesse, através da PCR; 2) desnaturação dos produtos resultantes da amplificação; 3) arrefecimento do DNA desnaturado, para

maximizar o self-annealing; 4) detecção da diferença de mobilidade do ssDNA pela eletroforese, sob condições não desnaturantes (Dong & Zhu, 2005).

Uma análise semi-automatizada de SSCP utiliza sistemas de coloração para uma detecção mais rápida dos produtos a analisar e consequente eliminação de técnicas de radioatividade.

Estudos demonstram que esta técnica pode ser utilizada para a genotipagem uma vez que permite detetar variações nas sequencias que se encontram fora do local comum de reconhecimento bem como podem detetar polimorfismos de DNA e mutações pontuais numa variedade de posições em fragmentos de DNA (Albuquerque & Costa, 2003).

2.2.2. Análise de Heterodupletos (HA)

Alguns métodos foram desenvolvidos para identificar mutações em pequenos fragmentos de DNA, entre os quais a análise de heteroduplexos (HA) (Tchernitchko *et alli.*, 1999).

O principal objetivo desta técnica consiste em separar os homoduplexos (tipo mutante e normal) e os heteroduplexos dos fragmentos de DNA, com base nas suas conformações, sob condições nativas.

O HA convencional envolve o uso de um gel de poliacrilamida de eletroforese, na presença de aditivos neutros, com por exemplo: o glicerol, a ureia, o etilenoglicol, e a formamida, que vão facilitar a discriminação entre homo e heteroduplexos (Tian *et al.*, 2000).

Assim a análise de heteroduplexos fundamenta-se na separação das moléculas híbridas de DNA, por meio de um sistema de eletroforese, em condições não desnaturantes.

Por aquecimento, a dupla hélice de DNA de amostras problema (potencialmente com mutação) são desnaturadas e a seguir são hibridizadas com amostras sem mutação, originando os híbridos homo e heteroduplexos (se efetivamente existe mutação na amostra problema) (Hirata *et al.*, 2006).

As moléculas híbridas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, sendo que as moléculas de homoduplexos e heteroduplexos apresentam diferentes migrações no gel de eletroforese.

A detecção dos produtos pode ser realizada por coloração com brometo de etídeo ou nitrato de prata.

Podem utilizar-se géis especiais como o MDE, para aumentar a resolução da técnica, bem como ureia a 15% para melhorar a definição das bandas.

O tamanho do produto detetado por HA varia entre os 200 e os 600pb, no entanto tem-se realizado a detecção de algumas mutações para produtos com tamanho superior (Hirata *et al.*, 2006).

2.2.3. CSGE – Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

Esta técnica, baseada na conformação dos ácidos nucleicos, tem sido cada vez mais utilizada para detetar mutações em diferentes genes, por exemplo nos fatores VIII e IX da hemofilia, genes do colagénio e os genes BRCA1 e BRCA2 (Fard-Esfahani *et alli.*, 2005).

O método baseia-se na migração diferencial de heteroduplexos de DNA, durante a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em condições desnaturantes.

O ambiente ligeiramente desnaturante provoca um aumento da capacidade de ocorrerem mutações pontuais que são suscetíveis de provocarem alterações conformacionais, causadas pela inadaptação de uma única base durante o processo de PAGE. A presença de desnaturante vai amplificar as alterações de conformação. Essa amplificação é devida à formação de uma curva ou de uma torção do fragmento de DNA, provocada pela rotação, para fora, de uma das bases incompatíveis da dupla hélice, sob condições ligeiramente desnaturantes (Fard-Esfahani *et alli.*, 2005).

Uma das desvantagens deste método é a sua incapacidade para detetar a presença de algumas mutações (Fard-Esfahani *et alli.*, 2005).

2.3. Métodos baseados na Temperatura de Melting dos A.N

Associado à hibridização dos ácidos nucleicos está uma propriedade denominada temperatura de melting ou de fusão (T_m) (Cabeda *et al.*, 2012).

Esta temperatura é definida como a temperatura à qual metade da sequência de bases de uma determinada molécula de DNA se encontra desnaturada (Bosson, 2002).

A temperatura de melting depende da sequência do oligonucleotídeo e em particular da sua riqueza em guanina/citosina, bem como da composição do solvente utilizado (Persing *et alli.*, 1993).

Assim sendo, as técnicas baseadas na desnaturação assentam no princípio que a temperatura a que uma molécula desnatura (T_m) depende da sua sequência, pelo que qualquer alteração desta induz habitualmente uma alteração na T_m , que será detetável (Cabeda *et al.*, 2012).

2.3.1. DHPLC – denaturing high-performance liquid chromatography

Desde a década de 80 que a técnica de DHPLC tem sido muito utilizada, inicialmente, para separar cadeias de ssDNA de tamanhos diferentes (Bosson, 2002).

Mais recentemente este método tem sido usado para diferentes fins, como para separar dupletos de DNA.

A DHPLC é uma tecnologia relativamente recente, que compara dois ou mais cromossomas numa mistura de produtos desnaturados ou renaturados com tamanho até 1000bp (Spielgelman *et al.*, 2000).

O DHPLC tem variadas aplicações, nomeadamente: a descoberta de sequências com polimorfismos, o mapeamento de genes, a análise de genes, os rastreios de mutações, discriminação direta de alelos, análise de produtos de extensão de primers, quantificação de genes de expressão (Spielgelman *et al.*, 2000).

A presença de um único ou de múltiplos não emparelhamentos (mismatches) é revelada pelo aparecimento de um ou mais picos de eluição, que ocorreram precocemente, no perfil cromatográfico, representando assim, heteroduplexos (Spielgelman *et al.*, 2000).

O DHPLC é um método rápido e sensível que deteta mutações genéticas. Em termos de custos é um método económico sendo capaz de rastrear um largo número de amostras num período de tempo relativamente curto (Hurtle *et alli.*, 2002).

A técnica está dividida em quatro etapas: amplificação através da PCR, quantificação, hibridização e por último, análise dos produtos hibridizados (Hurtle *et alli.*, 2002).

2.3.2. DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Na técnica da eletroforese em gel desnaturante em gradiente (DGGE) é aplicado um gradiente de desnaturação no próprio gel, para detetar mutações desconhecidas (Landegren, 1996). A execução desta técnica consiste na produção do gel de acrilamida, misturando em proporções crescentes duas soluções de acrilamida. Sendo que uma dessas soluções contém 0% de concentração desnaturante (por exemplo ureia) e outra contém uma concentração máxima de desnaturante (Cabeda *et al.*, 2012).

Esta técnica permite a separação de moléculas de DNA que difiram entre si numa única base. A DGGE e suas variantes têm sido utilizadas com sucesso para detetar mutações associadas com a resistência a antibióticos (Ferreira & Sousa, 2000).

Os fragmentos de DNA são aplicados num gel de poliacrilamida que contém um gradiente linear de concentrações crescentes de um desnaturante químico. As cadeias de DNA vão-se separando em regiões específicas (domínios de fusão), de acordo com as propriedades intrínsecas de desnaturação de cada DNA, à medida que vão migrando no gel e encontrando diferentes concentrações do desnaturante. Isto faz com que a mobilidade no gel diminua. (Ferreira & Sousa, 2000).

2.3.3. CDGE – Constant Denaturing Gel Electrophoresis

Esta técnica é uma variante da técnica DGGE. Nesta técnica, a concentração de desnaturante (ou temperatura da eletroforese) que oferece uma melhor resolução é aquela cuja concentração, a partir de um gel de DGGE paralelo ou perpendicular, é mantida constante (BioRad, 1996).

A concentração ótima de desnaturante que deve ser utilizada na técnica de CDGE é determinada a partir da divisão máxima entre o DNA mutante e o DNA do tipo selvagem (wild-type), visualizada no gel (BioRad, 1996).

Após identificar uma mutação pelo método DGGE, a técnica de CDGE pode ser rapidamente usada para rastrear a presença de novas mutações (BioRad, 1996).

2.3.4. TTGE – Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

O TTGE é uma variante da técnica DGGE, sem a necessidade de usar um gradiente químico de desnaturação (BioRad, 1996).

O DNA mutante e do tipo selvagem é amplificado, a partir do gene de interesse, e é depois carregado num gel de poliacrilamida que contém uma concentração constante de ureia.

Esta técnica aplica um gradiente térmico temporal, ou seja, a eletroforese está a decorrer a uma única temperatura, mas esta vai variar durante a corrida eletroforética (a temperatura começa a aumentar gradual e uniformemente). O resultado é um gradiente de temperatura paralelo à corrida de eletroforese (Cabeda *et al.*, 2012).

A vantagem desta técnica em relação à DGGE é o facto de ser mais barata e mais reprodutível. Em contrapartida é mais difícil de definir a T_m do DNA estudado (Cabeda *et al.*, 2012).

3. Técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos

3.1. Técnicas baseadas no PCR

3.1.1. PCR

Nos anos 80 Kary Mullis desenvolveu a reação de polimerase em cadeia (PCR), permitindo deste modo amplificar mais de mil milhões de vezes regiões específicas de DNA (Kubista *et alli.*, 2006).

O princípio subjacente à técnica é muito simples: a partir de uma DNA polimerase termo-estável, é amplificado um segmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois primers oligonucleotídicos específicos (Cabeda *et al.*, 1999).

A reação de amplificação ocorre em ciclos sucessivos e cada ciclo envolve um passo de desnaturação da molécula de DNA, que por aquecimento (aproximadamente 95°C), separa a dupla cadeia de DNA em duas cadeias simples de DNA; um passo de hibridização/annealing do primer alvo, que ocorre por um abaixamento da temperatura (entre 50-72°C), ou seja esta temperatura vai permitir ocorrer uma ligação específica de um oligonucleótido sintético, específico para a região 5' do segmento de DNA a amplificar e um último passo de extensão enzimática dos primers, entre os 68-72°C, em que a DNA polimerase inicia a síntese da cadeia complementar ao molde (Roche Molecular Systems, 2003).

Os produtos resultantes do último passo podem ser amplificados no próximo ciclo e como em cada ciclo se duplica a quantidade de DNA alvo que existia no início do ciclo, no final do processo amplifica-se duas vezes o segmento de DNA alvo. Assim, 35 ciclos de PCR originam uma amplificação de cerca de $2^{35} \approx 10^9 = 1,000,000,000$ vezes (Cabeda *et al.*, 1999).

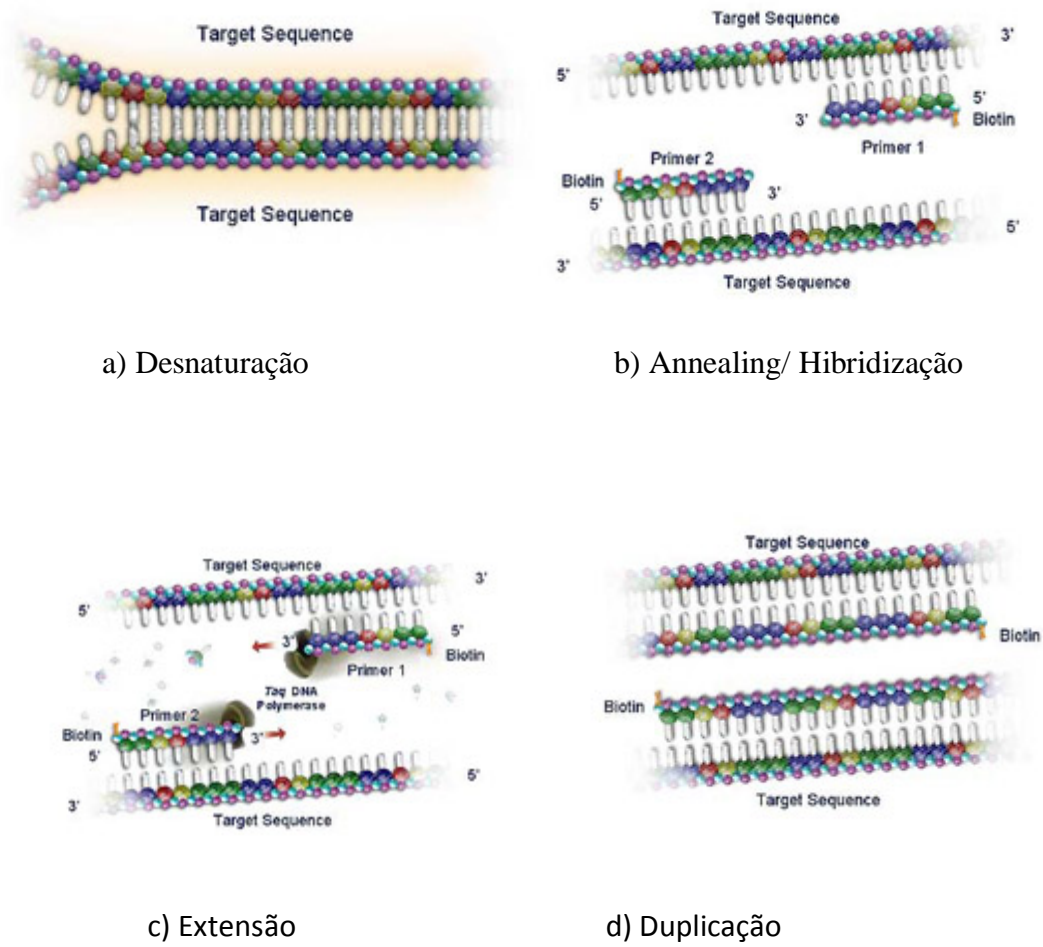


Figura 1. Esquema representativo da reação de polimerase em cadeia – PCR. a) Desnaturação. b) Annealing ou Hibridização. c) Extensão das cadeias. d) Duplicação do número de cadeias de DNA (Mendes, 2008).

3.1.2. RT-PCR

A análise da expressão genética é cada vez mais importante nas pesquisas biológicas. Para isso recorre a metodologias de PCR em tempo real de transcrição reversa (RT-PCR) que é um método específico e sensível, bastante útil para a detecção de mRNA raros ou para a análise de amostras disponíveis em quantidades limitadas (Vandesampele *et alli.*, 2002).

A Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) é uma reação de PCR normal mas que é realizada a partir de um DNA sintetizado por transcrição reversa a partir de uma molécula de RNA (Roche Molecular Systems, 2003).

Tendo em conta que o RNA não serve de molde para a PCR, este deve ser então inicialmente copiado para a cDNA (DNA complementar) através da transcriptase reversa. De seguida a cDNA já pode ser amplificada por uma enzima da PCR tradicional, para um nível em que seja possível deteta-la (Kawasaki, 1990).

Esta técnica utiliza a DNA polimerase dependente do RNA (transcriptase reversa) e a DNA polimerase dependente do DNA (a Taq DNA polimerase normal). Deste modo a RT-PCR pode ser efetuada utilizando sequencialmente as duas enzimas (ajustando as condições necessárias à reação) ou através da utilização de enzimas especiais que possuem ambas as atividades (Cabeda *et al.*, 2012).

3.1.3. Nested-PCR

A Nested-PCR é uma variante da técnica da PCR convencional, que tem a finalidade de amplificar uma região alvo de DNA (utilizando os produtos de DNA de uma primeira reação de PCR, como fonte para uma segunda reação de PCR). Assim este método utiliza um par de primers (iniciadores) na primeira reação, seguida por uma segunda reação que utiliza um par de primers mais internos, garantindo assim uma maior especificidade da técnica (Mothersheed & Whitney, 2005).

Devido ao elevado grau de sensibilidade que apresenta este método é bastante útil para a detecção de vários tipos de agentes patogénicos em amostras clínicas (Mothersheed & Whitney, 2005).

No entanto esta técnica exige determinadas precauções nomeadamente, realizar esta operação numa sala isolada e que deve dispor de um sistema de radiação ultravioleta para descontaminar o laboratório (Cabeda *et al.*, 2012).

3.1.4. qPCR

Os métodos quantitativos para a análise de genes de DNA têm sido cada vez mais utilizados para quantificar a transcrição de genes específicos (ex: o gene humano HER2 cuja transcrição pode ser amplificada cerca de 30%, o que está associado a tumores da mama) (Heid *et alli.*, 1996).

A técnica de quantificação por PCR mede os produtos de PCR através de uma sonda fluorogénica, duplamente marcada (ex: Taq Man Probe). Este método proporciona uma quantificação precisa e reprodutível de cópias do gene alvo.

É um método extremamente preciso e menos trabalhoso comparativamente às restantes tecnologias de quantificação (Heid *et alli.*, 1996).

Nas reações de qPCR (real-time PCR) a sonda fluorogénica, adicionada à mistura, por deteção da fluorescência vai permitir avaliar a concentração de produtos de PCR que irá ser proporcional à fluorescência emitida pelo tubo de reação (Cabeda *et al.*, 2012).

3.2.Strand Displacement Amplification (SDA)

SDA é um método isotérmico, *in vitro*, utilizado para amplificar o DNA. Esta técnica fornece uma poderosa amplificação que é compatível com os ensaios de diagnóstico dos ácidos nucleicos (Walker *et al.*, 1992).

A técnica de SDA necessita de uma enzima de restrição, para fazer a clivagem da amostra de DNA, antes de ocorrer o passo de amplificação, para que deste modo seja possível gerar um fragmento amplificável, com as extremidades 5' e 3' bem definidas.

As reações de SDA ocorrem em três passos muito simples: um primeiro passo em que a amostra de DNA alvo é desnaturada por ação do calor, na presença de primers e de outros reagentes; um segundo passo em que a HincII produz um corte (“*nick*”) numa das

cadeias; e por último um passo final em que o DNA alvo é duplicado pela ação da “*klenow*” polimerase. Os passos 2 e 3 realizam-se em sequência e de modo isotérmico a 37°C (Walker *et al.*, 1992).

No entanto podem surgir algumas complicações na etapa de restrição, isto porque as sequencias de DNA devem ser específicas nos locais de restrição e também o DNA deve ser de cadeia dupla para que seja possível a clivagem com a enzima de restrição (Walker *et al.*, 1992).

3.3. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) / Transcript Mediated Amplification (TMA)

“Nucleic acid sequence-based amplification” (NASBA) é um sistema isotérmico e sensível, baseado no sistema de amplificação por transcrição (TAS). Este sistema foi concebido especificamente para detetar sequências alvo de RNA (Deiman *et al.*, 2002).

Os métodos NASBA em associação com o seu recente sucessor NucliSens realizam uma serie de reações que permitem produzir uma molécula de DNA a partir de uma molécula de RNA. Esta molécula de DNA tem a particularidade de possuir o promotor do fago T7 (ver abaixo), pelo que a RNA polimerase deste fago o reconhece como um gene a transcrever, produzindo inúmeras cópias de RNA (Deiman *et al.*, 2002).

A reação de amplificação é isotérmica e ocorre a uma temperatura de 41°C. Nesta reação estão envolvidas três enzimas: a transcriptase reversa (RT), que vai produzir uma molécula de DNA a partir de uma molécula de RNA, a RNase H, que vai degradar a molécula de RNA inicial, seguindo-se a produção da cadeia complementar pela mesma RT que produziu a primeira cadeia de DNA, e por último a T7 RNA polimerase, que vai produzir várias cópias de transcrito do gene alvo, isto é possível porque o primeiro primer possui uma sequência 5' não homóloga contendo o promotor (T7) desta enzima. Assim cada uma destas cópias pode ser replicada pela RT, amplificada, tornando-se o processo cíclico (Cabeda *et al.*, 2012).

Uma das grandes vantagens do NASBA é a produção de fragmentos amplificados de ssRNA (single strand RNA) que pode ser utilizado diretamente no próximo ciclo de amplificação ou pode ser sondado para a deteção, sem ocorrer desnaturação da cadeia.

Para além disso, o cDNA é reutilizado, resultando num aumento exponencial dos fragmentos de RNA amplificados, excedendo a concentração dos primers em pelo menos 10 vezes (Loens *et alli.*, 2005).

Como em todos os métodos, também os NASBA possuem algumas desvantagens, incluindo a dificuldade em manter a integridade do RNA. Além disto, devido à especificidade das reações que dependem de enzimas termo sensíveis, a temperatura da reação tem de ser muito bem controlada, não podendo exceder os 42° C. Finalmente, o comprimento das sequências de RNA alvo amplificadas, deve estar contido no intervalo de 120 a 250 nucleótidos, visto que um comprimento que se encontre fora deste intervalo torna a amplificação menos eficiente (Loens *et alli.*, 2005).

Esta tecnologia permite assim obter ácidos nucleicos altamente purificados, a partir de diversos tipos de amostras.

Uma variante da NASBA, a “Transcript mediated amplification” (TMA) difere da NASBA apenas nas enzimas utilizadas. O GEN-PROBE TMA utiliza para a deteção dos produtos de reação o formato de HPA (Hybridization Protection Assay), que é uma técnica que utiliza uma sonda de DNA específica, envolvida com uma molécula detetora de éster de acridinio, que emite um sinal quimiluminescente, na presença de amplificação. Essa sonda é hibridizada com o RNA produzido na reação de TMA e a separação dos híbridos é possível através de uma solução que destrói seletivamente o éster de acridinio. Por sua vez, este éster encontra-se protegido dentro da dupla hélice e vai emitir quimiluminescência quando exposto aos reagentes de deteção.

Devido ao facto de todo este procedimento ocorrer num único tubo de reação, o risco de contaminações é minimizado (GenProbe, 2000).

Uma das principais vantagens desta tecnologia é a alta sensibilidade em detetar microrganismos num curto espaço de tempo. Alguns exemplos de microrganismos passíveis de serem detetados são: *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, o vírus do HIV, entre muitos outros (GenProbe, 2000).

3.4.Ligase Chain Reaction (LCR)

Esta técnica desenvolvida pela Abbot utiliza primers muito longos que abrangem quase toda a sequência sujeita a análise. A zona central da sequência alvo que não está

coberta, após a hibridização dos primers, é sintetizada por uma polimerase, e os dois fragmentos são unidos por uma ligase. Assim é possível detetar-se o gene, através da união dos primers, que depende não só da hibridização como também da existência do gene alvo (Cabeda *et al.*, 2012).

4. Sistemas Multiplex para a deteção e caracterização de microrganismos

4.1. PCR Multiplex

Multiplex-PCR é uma extensão do PCR que tem como objetivo amplificar múltiplos alvos de DNA em simultâneo, usando diferentes pares de primers para cada alvo de DNA. Mais recentemente, esta técnica tem sido bastante utilizada para estudos de genotipagem e de polimorfismos pontuais (SNP) (Lee *et al.*, 2007).

O PCR multiplex é um sistema complexo composto por dois processos de otimização: inicialmente os primers de cada alvo de DNA devem ser otimizados, minimizando assim as interações entre primers e falsos alvos de DNA. Uma vez que os múltiplos alvos são amplificados num único tubo, de forma simultânea, é importante que os primers de um alvo não interajam com outros alvos ou primers. Se ocorrer alguma interação, a amplificação poderá ser afetada. Só depois de todo este processo de otimização é que a sequência de DNA desejada pode ser amplificada (Lee *et al.*, 2007).

O sistema Hyplex Blood Screen multiplex PCR-ELISA foi desenvolvido pela BAG, constitui um exemplo de um sistema multiplex que se encontra comercialmente disponível. Este sistema permite detetar bactérias patogénicas, responsáveis pela sepsia, em hemoculturas (Mothershed & Whitney, 2005).

O sistema PCR multiplex é também muito usado para detetar alvos específicos de espécies e alvos específicos de serogrupos numa única reação. Por exemplo, Taha desenvolveu um PCR multiplex para detetar *Neisseria meningitidis* em que seis pares de primers de serogrupos específicos são adicionados numa única reação (Mothershed & Whitney, 2005).

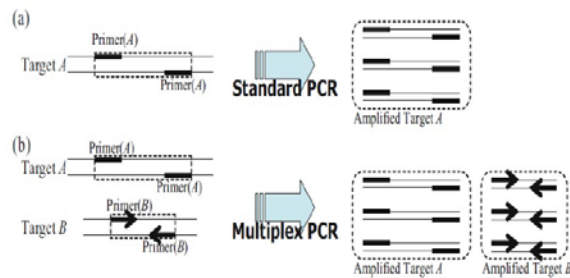


Figura 2. Esquema representativo do funcionamento da reação de polimerase em cadeia – PCR. a) PCR normal. b) PCR Multiplex (Lee *et al.*, 2007).

4.2. Microchips

A tendência para a miniaturização em Biologia Molecular tem o seu expoente máximo nas técnicas que envolvem microchips. Estas técnicas têm sido crescentemente utilizadas, ainda que mais na investigação do que no diagnóstico molecular (Lou *et alli.*, 2004).

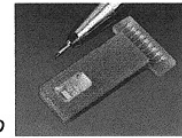
Os microchips podem ser de tipos e complexidades bem diferentes. Os mais simples são miniaturizações da técnica de dot-blot, envolvendo desde algumas dezenas ou centenas de sondas (macrochip de hibridização) a dezenas ou centenas de milhares (microchips de hibridização). Estes microchips são globalmente designados de chips de DNA e consistem em sistemas miniaturizados baseados na capacidade do DNA encontrar as suas sequências complementares ligando-se de uma forma altamente específica e reversível, conhecida como hibridização (Cuzin, 2001).

Estes microchips constituem assim, uma forma natural de evolução de técnicas à muito utilizadas (dot-blot), mas que nos últimos anos têm evoluído para níveis crescentes de complexidade, permitindo resolver problemas científicos a uma escala sem precedentes (figura 3).

- **Low complexity:** from 100 to 1000 probes
Dedicated analyses, diagnostic tools

➡ "Active" chips
Nanogen, MICAM™ (CEA, CIS bio international)

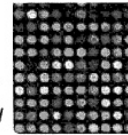
APIBio



- **Mean complexity:** from 1000 to 10 000 probes
global gene expression analysis

➡ MicroArrays ("off chip" technology)

Synteni,
Stanford



- **High complexity:** 100 000 probes +
global polymorphism analysis

➡ In situ synthesis
(oligonucleotide probes)

Affymetrix,
Protogene

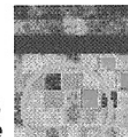


Figura 3. Esquema ilustrativo dos diferentes chips de DNA das várias tecnologias (Cuzin, 2001).

Noutros casos, os microchips permitem a execução miniaturizada, e com elevado grau de sensibilidade e reprodutibilidade de processos como a eletroforese (por exemplo o Bioanalyzer da Agilent). Outros tipos de microchips, bem mais complexos permitem executar no chip em paralelo dezenas a milhares de reações enzimáticas como qPCR, ou até mesmo processo complexos como a extração e purificação de ácidos nucleicos seguida de amplificação e caracterização dos ácidos nucleicos. O microchip μ TAS é um exemplo de um destes dispositivos miniaturizados, que combina todos os passos de um processo analítico numa serie de microcanais e microcâmaras interligadas num dispositivo planar, permitindo uma análise multiplexada (Gingeras *et alli.*, 2005).

4.3. Mass-Tag

A tecnologia Mass-Tag PCR consiste numa plataforma que permite a deteção microbiana, através de primers marcados por uma ligação fotoclivável com alvos, que variam consoante o peso molecular. Depois da amplificação por PCR, os alvos são lançados por radiação ultravioleta e analisados por espectroscopia de massa (Tokarz *et alli.*, 2009).

Para além de ser uma técnica rápida, sensível e económica, o Mass-Tag oferece outras vantagens, nomeadamente: a hibridização é necessária em apenas dois locais (frente e verso) do primer permitindo uma maior flexibilidade, muitos primers de PCR podem ser adaptados à técnica, e é uma técnica que permite uma análise multiplexada em apenas poucas horas (Briese *et alli.*, 2007).

A demonstrar o seu vasto potencial de aplicação, o Mass-Tag PCR tem sido usado para o diagnóstico diferencial de doenças respiratórias (Briese *et alli.*, 2005), bem como para o diagnóstico de agentes causadores da meningoencefalite e doenças entéricas.

Vários estudos confirmam a utilidade e a potencialidade da técnica para detetar rapidamente surtos, detetar focos infecciosos, bem como a vigilância e epidemiologia de patogénicos virais e bacterianos (Briese *et alli.*, 2007).

4.4.Luminex/xMAP

Outro exemplo da tecnologia multiplex muito utilizado, é o sistema Luminex, que usa uma tecnologia baseada no xMAP, que tem vindo a ganhar popularidade entre os outros métodos baseados nos ácidos nucleicos, devido à sua capacidade para detetar vários alvos num único teste (multiplex), enquanto mantém uma elevada sensibilidade e especificidade dos resultados (Mothershed & Whitney, 2005).

O sistema Luminex/xMAP incorpora microsferas de poliestireno com 5,6µm, que são internamente revestidas por dois fluorocromos espectralmente distintos. Usando quantidades precisas de cada um destes fluorocromos, é possível criar uma matriz, ou seja, 100 conjuntos diferentes de microsferas com espectros específicos. Por sua vez, cada conjunto de microsferas pode ter diferentes reagentes à sua superfície.

Devido ao facto de poderem ser distinguidas através dos diferentes reagentes, estas podem combinar-se permitindo medir 100 análises em simultâneo num único tubo de reação (Dunbar, 2005).

Um terceiro fluorocromo é acoplado numa molécula indicadora, que vai quantificar a reação biomolecular que ocorreu à superfície da microesfera.

As microsferas são colocadas individualmente num fluído, que flui rapidamente, à medida que passam por dois lasers separados no analisador Luminex. A um comprimento de onda de 635nm, um laser de diodo vermelho excita os dois

4.5. Sequenciação

Na década de 60 foram efetuadas as primeiras tentativas para sequenciar o DNA através da análise detalhada de produtos de degradação (Shendure *et al.*, 2008). No entanto o comprimento e a complexidade do polímero de DNA mostraram ser significativamente problemáticos. Em 1977 os grupos liderados por Fred Sanger e Walter Gilbert publicaram, de forma independente, descrições de metodologias para sequenciar o DNA, tendo como base a eletroforese em gel, capaz de separar fragmentos de DNA com resolução de um único par de bases (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977).

Nos anos que se seguiram, devido à rápida disseminação destas tecnologias e a progressão para protocolos robustos, culminou em avanços científicos nas áreas da genética e da biologia molecular. Já nos anos 80, o desenvolvimento e a comercialização de plataformas automáticas de sequenciação, garantiram o domínio do protocolo desenvolvido por Sanger, também conhecido como sequenciação dideoxi, que se tornou o método de eleição para as décadas seguintes (Hunkapiller *et alli.*, 1991; Shendure *et al.*, 2008).

4.5.1. Sequenciação de 1ª geração

4.5.1.1. Sequenciação de Sanger

Frederik Sanger e os seus colaboradores desenvolveram o método de Sanger, também conhecido como o método do terminador de cadeia. Este método utiliza os trifosfatos de dideoxinucleótidos (ddNTPs) como terminadores de cadeia de DNA. Estes terminadores de cadeia não possuem o grupo 3'-OH necessário para estabelecer a ligação fosfodiéster entre nucleótidos durante a extensão das cadeias de DNA, levando deste modo à terminação do alongamento da cadeia de DNA (Athanasίου *et al.*, 2010).

O método clássico de Sanger requer uma cadeia simples de DNA alvo, um oligonucleótido curto de cadeia simples complementar à cadeia de DNA que vai funcionar como primer na reação de polimerização, quatro deoxinucleótidos (dNTPs) para a elongação do primer na reação de extensão, dideoxinucleótidos (ddNTPs) como terminadores da reação e uma DNA polimerase para alongar o primer iniciador na reação de extensão (Athanasίου *et al.*, 2010).

A amostra é dividida em quatro reações de sequenciação separadas, contendo os quatro deoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP). A cada reação é adicionado apenas um dos quatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP). A incorporação de dideoxinucleótidos termina a extensão das cadeias, resultando em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Estes fragmentos marcados são desnaturados pelo calor e separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Cada uma das quatro reações é corrida em poços individuais, com visualização por autoradiografia, no caso da marcação radioativa. Nos casos automatizados a visualização é realizada através da excitação de um fluorocromo por um laser (Athanasίου *et al.*, 2010).

4.5.1.2. Pirosequenciação

A pirosequenciação surge como uma vertente inovadora da sequenciação. Esta técnica permite uma caracterização detalhada dos ácidos nucleicos, possuindo uma elevada precisão, flexibilidade, processamento paralelo, e facilidade em ser automatizada. Para além de todas estas vantagens a técnica dispensa a necessidade do uso de primers marcados, nucleótidos marcados e eletroforese em gel (Ronaghi, 2001).

A pirosequenciação é uma técnica de sequenciação de DNA baseada na deteção de pirofosfato libertado (PPi) durante a síntese de DNA. Esta técnica decorre numa cascata de reações, onde se gera uma luz visível que é proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Ronaghi, 2001).

A cascata inicia-se com uma reação de polimerização em que o PPi inorgânico é libertado devido à incorporação dos nucleótidos. O PPi é convertido em ATP pela ATP sulfúrilase e produz luz. Como o nucleótido adicionado é conhecido, a sequência de DNA pode ser determinada (Ronaghi, 2001).

4.5.2. Sequenciação de 2ª geração

A capacidade de sequenciar o DNA constitui uma importante ferramenta na pesquisa biológica moderna. A introdução de tecnologias de sequenciação massivamente paralela precedidas de um passo prévio de amplificação do DNA a sequenciar, ou seja, as tecnologias de sequenciação de segunda geração, vieram dar um precioso contributo para o avanço na sequenciação de genomas. Assim sendo, a sequenciação de segunda geração apresenta algumas plataformas que produzem grandes quantidades (normalmente de centenas de milhar a milhões) de sequências de DNA (Imelfort & Edwards, 2009).

O primeiro grande sucesso da sequenciação de segunda geração foi o sistema de pirosequenciação GS20, desenvolvido pela 454 Life Sciences (empresa adquirida pela Roche, o que lhe permitiu efectuar a comercialização do sistema). Esta plataforma permite sequenciar mais de 20 milhões de pares de bases em sensivelmente quatro horas (Imelfort & Edwards, 2009).

Em 2007 este sistema foi substituído pelo modelo FLX-GS, que é capaz de sequenciar mais de 100 milhões de pares de bases no mesmo período de tempo.

Mais recentemente outros dois sistemas vêm competir com o FLX-GS. O sistema SOLID da Applied BioSystems (AB) e o sistema SOLEXA da Illumina (Imelfort & Edwards, 2009).

4.5.2.1. Pirosequenciação (GS-FLX – Roche)

Em 2005 foi introduzido no mercado o sistema de pirosequenciação GS. Nesta técnica os fragmentos de DNA a sequenciar ligam-se a adaptadores específicos o que permite a ligação entre os fragmentos de DNA e uma esfera de material sintético (bead). Em seguida é realizada uma reacção de PCR em emulsão, o que permite fazer PCRs em gotículas aquosas separadas entre si por uma abundante fase oleosa, o que transforma cada gotícula num reservatório isolado. Cada gotícula aquosa possui uma bead com uma e apenas uma molecular de DNA a sequenciar e os reagentes necessários para realizar a amplificação local desta molécula. Como cada molécula amplificada possui também os adaptadores, fica fisicamente ligada à bead por complementaridade de bases (Ansorge, 2009).

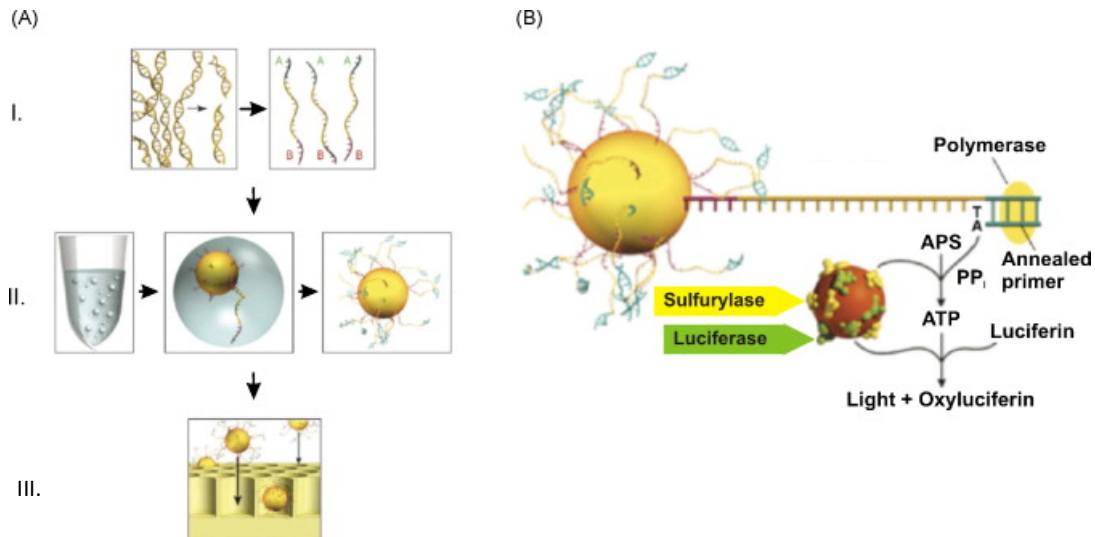


Figura 5. (A) Esquema representativo do funcionamento do sistema de sequencição GS. (I) Construção da “biblioteca” e ligação aos adaptadores (II) Formação de gotículas, seguindo-se uma reação de PCR em emulsão. (III) As esferas encaixam perfeitamente nos poços. (B) Esquema ilustrativo da reação de pirosequenciação (Ansorge, 2009).

Quando os ciclos de PCR se completam, cada bead com o seu fragmento amplificado é colocado numa placa que possui milhões de pequenos reservatórios (poços) com dimensão apenas suficiente para que uma (e apenas uma) bead possa ficar nela depositada. De seguida, o restante espaço do poço é preenchido com beads de menores dimensões que possuem todos os reagentes e enzimas necessários para a realização de uma pirosequenciação, com exceção dos nucleótidos. A placa é então colocada no equipamento, alinhada com um chip ótico, que inclui feixes de fibra de vidro. As fibras de vidro são excelentes condutoras de luz, permitindo a deteção e posicionamento da luz emitida. Como tal cada bead tem uma posição de deteção específica (Ansorge, 2009).

De seguida, são adicionados em sucessão nucleótidos não marcado, para que se inicie o processo de síntese da cadeia complementar. A incorporação de cada base na cadeia em crescimento vai libertar um grupo pirofosfato que pode ser detetado na luz emitida tal como descrito para a pirosequenciação de 1ª geração (Ansorge, 2009).

Assim sendo, conhecendo a identidade do nucleótido adicionado em cada passo, através do sinal, é possível saber qual a sequência de bases incorporadas pela polimerase na sequência da cadeia crescente de DNA (Ansorge, 2009).

Ultimamente este método tem conseguido alargar o intervalo de leitura para cerca de 400-500 bases emparelhadas e tem sido aplicado para estudos de sequenciação genómica (bacteriana, animal e humana).

O equipamento mais recente (454 FLX Titanium) utiliza uma placa “*picotiter*”, a qual possui poços cuja dimensão não ultrapassam 1 µm de diâmetro. Desta forma, o grau de compactação obtido permite quintuplicar o número de reações de sequenciação realizadas em paralelo (Ansorge, 2009).

4.5.2.2. SOLID

O sistema SOLiD comercializado pela Applied Biosystems permite uma sequenciação massivamente paralela de fragmentos de DNA amplificados por clonagem e ligados a esferas magnéticas (Applied Biosystems, 2008).

A metodologia baseia-se numa ligação sequencial de oligonucleótidos com sequências específicas e marcados com um fluorocromo diferente em função da sua sequência. Esta reação, catalisada por uma ligase, permite, através da deteção sequencial das fluorescências associadas aos oligonucleótidos incorporados, detetar a sequência da molécula molde (Applied Biosystems, 2008).

A plataforma SOLiD é a única que utiliza uma ligase. A reação de ligação é baseada no reconhecimento simultâneo de vários nucleótidos da sequência do oligonucleótido e da molécula molde e por esse motivo é menos provável a ocorrência de erros na sequenciação.

As esferas são depositadas na superfície de uma placa de vidro e imobilizadas por uma fina camada de gel de acrilamida ou por uma ligação covalente direta à superfície. Em cada ciclo, existe uma série de sondas (oligonucleótidos) devidamente marcadas e que vão competir pela ligação ao primer de sequenciação e à molécula de DNA molde (Mendes, 2008).

Para a produção de uma sequência, são utilizados 5 primers diferentes, com comprimentos que diferem entre si por um nucleótido. Desta forma, a sequência obtida resulta de um conjunto de leituras parcialmente sobreponíveis, o que constitui um facto

de auto verificação dos resultados que contribui também para uma menor probabilidade de erros de sequenciação.

Assim, o sistema SOLiD, apesar de permitir apenas leituras de pequena extensão, constitui uma plataforma robusta com inúmeras aplicações no campo da sequenciação de novo, mas particularmente na resequenciação em larga escala e na avaliação da expressão génica entre outras (Applied Biosystems, 2008).

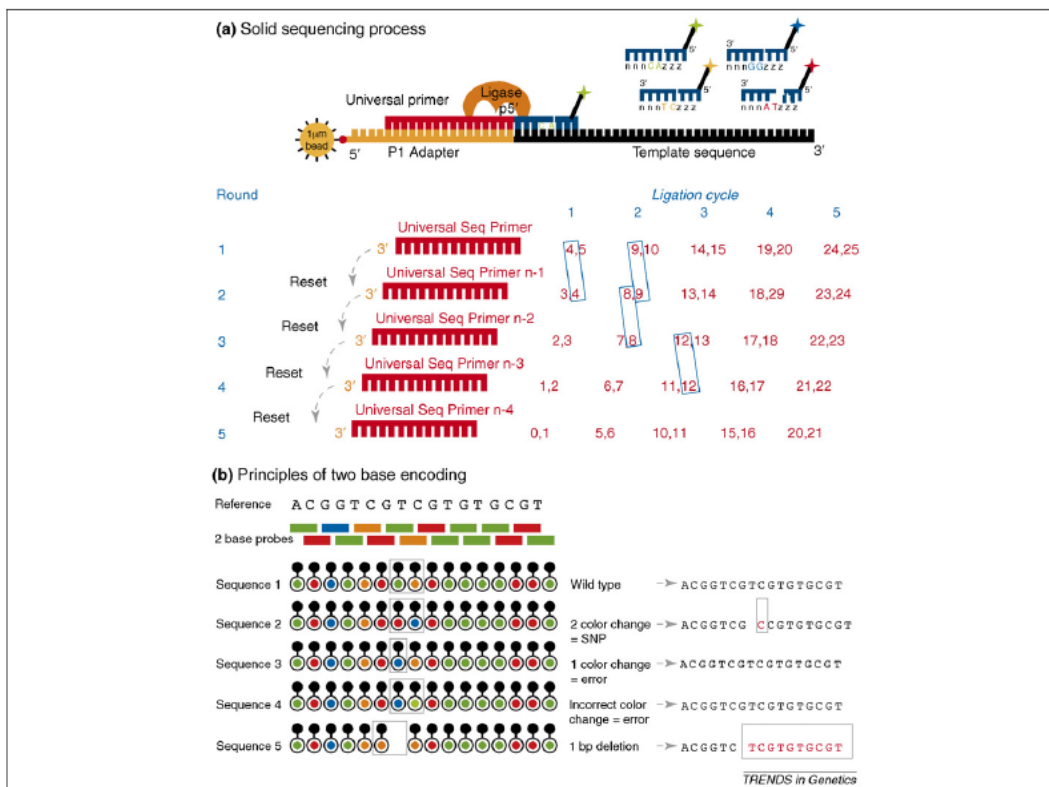


Figura 6. Esquema representativo do sistema SOLiD. (a) Esquema indicando a sucessão de primers e ciclos de sequenciação. (b) Esquema indicando a interpretação sucessiva do código de cores e seqüências de nucleótidos (Mardis, 2007).

4.5.2.3. Illumina

A plataforma de sequenciação Solexa foi comercializada em 2006 e adquirida pela Illumina no início do ano seguinte.

O princípio da técnica baseia-se na sequenciação por síntese química, que utiliza nucleótidos terminadores reversíveis para as quatro bases da molécula. Cada uma dessas

bases é marcada com um corante fluorescente diferente e com uma DNA polimerase capaz de as incorporar (Ansorge, 2009).

Os fragmentos de DNA ligam-se nas duas extremidades a adaptadores (oligonucleótidos sintéticos com sequencia pré-determinada) e após a desnaturação são imobilizados num suporte sólido. A superfície do suporte é revestida com oligonucleótidos complementares dos adaptadores pelo que retém por complementaridade as moléculas a sequenciar. Cada fragmento simples é assim imobilizado ao suporte sólido por uma das extremidades, através da hibridização com o oligonucleótido do suporte por hibridização (Ansorge, 2009).

Os adaptadores que estão à superfície do suporte funcionam ainda como primers para a reação de amplificação, que é necessário ocorrer para que seja possível obter um sinal com intensidade suficiente para detetar as bases.

Depois dos ciclos de PCR, são criadas cerca de 1000 cópias de fragmentos à superfície, todas localizadas na mesma zona onde ocorreu a hibridização inicial. Tal ocorre porque como as duas extremidades do fragmento a amplificar possuem adaptadores, no final da amplificação, a molécula sintetizada pode formar uma ponte com outro oligonucleótido vizinho através da outra extremidade, e este novo oligonucleótido é que será o primer para a nova reação (Ansorge, 2009).

Após a fase de amplificação inicia-se a reação de sequenciação, na qual são utilizados os nucleótidos terminadores fluorescentes. Após a incorporação destes na cadeia de DNA, os terminadores e as suas posições são detetados e identificados através do fluorocromo pela câmara CCD. De seguida reinicia-se um novo ciclo de síntese. Em cada ciclo é possível obter um comprimento de sequência de cerca de 35 nucleótidos, permitindo detetar paralelamente e em simultâneo pelo menos 40 milhões de colónias sequenciais (Ansorge, 2009).

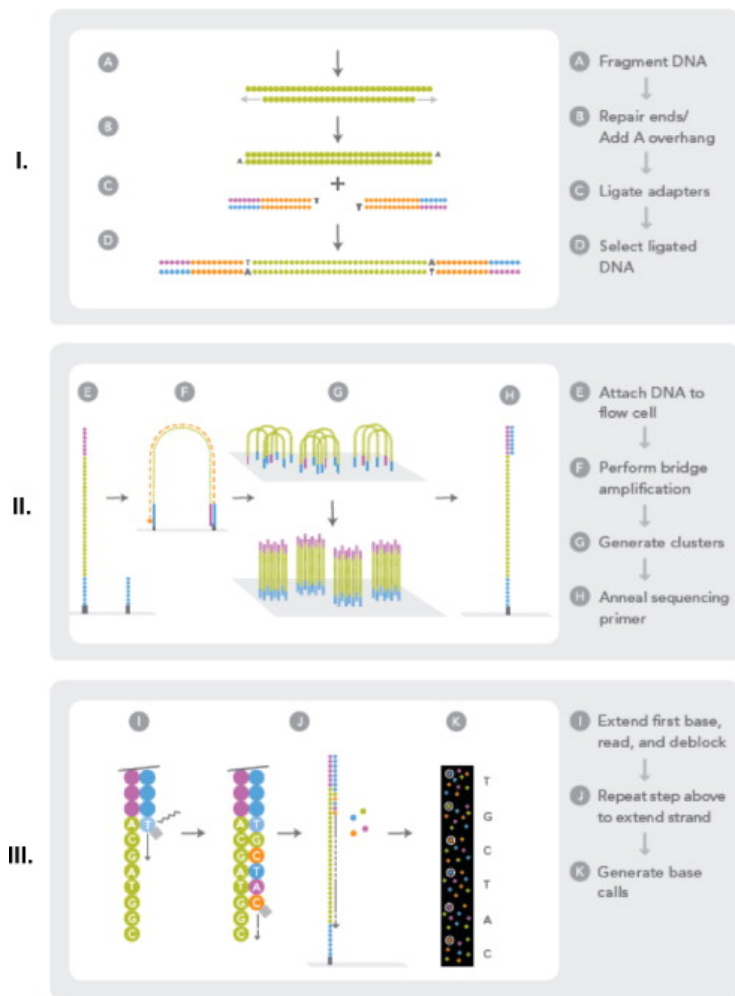


Figura 7. Esquema representativo da plataforma Solexa.

I) Fragmentação e ligação aos adaptadores.

II) Amplificação “bridge” utilizando os primers ligados ao suporte sólido e os adaptadores do fragmento de DNA.

III) Sequencição dos fragmentos de DNA (Ansorge, 2009).

4.5.3. Sequencição de 3ª geração

A sequencição de terceira geração constitui um avanço relativamente à sequencição de 2ª geração, sobretudo devido à enorme sensibilidade dos sensores que utiliza. Esta sensibilidade sem precedentes, permitiu desenvolver sistemas miniaturizados à escala molecular, que trabalhando com uma única molécula, dispensam a fase inicial de amplificação característica de todos os sistemas anteriores (Schadt *et al.*, 2010).

Esta miniaturização à escala nanoscópica tem como vantagem, a maior rapidez e economia dos processos, o que tem permitido uma vertiginosa redução dos custos de sequencição, bem como em alguns casos, potencialmente dos custos dos próprios equipamentos. No entanto nem tudo são vantagens, já que ao trabalhar com moléculas únicas, estes sistemas podem sofrer de problemas de representatividade da amostra, e estão criticamente dependentes da inexistência de erros nos processos enzimáticos

subjacentes. Como se sabe que mesmo as melhores enzimas possuem uma taxa de erro superior a zero, este facto indica que estas técnicas poderão necessitar de sistemas de auto validação e verificação de erros (Schadt *et al.*, 2010).

4.5.3.1. Pacific Biosciences SMRT

O “Single Molecule Real Time” (SMRT ©TM) é um instrumento de sequenciação recentemente desenvolvido pela Pacific Biosciences.

O princípio da técnica baseia-se na sequenciação em tempo real de uma única molécula. Este feito é conseguido num chip que possui milhares de “*zero-mode waveguides*” (ZMWs). A reação de sequenciação do fragmento de DNA é realizada por uma DNA polimerase, que está covalentemente ligada na base de cada ZMW para garantir que cada DNA polimerase se encontre na zona de deteção do ZMW (Pareek *et al.*, 2011).

Durante a reação de sequenciação o fragmento de DNA é alongado pela DNA polimerase com dNTPs que são marcados com fluoróforos de cores diferentes na fração terminal do fosfato. A sequência de DNA é então determinada através da fluorescência dos nucleótidos, que é imediatamente interrompida após a formação de uma ligação fosfodiéster que provoca a difusão do fluoróforo para fora da zona ZMW (Pareek *et al.*, 2011).

4.5.3.2. Helicos (Heliscope Sequencing)

Em 2007 a Helicos introduziu o primeiro sistema que sequencia uma única molécula de DNA. Os fragmentos do ácido nucleico a analisar são hibridizados com os primers e ancorados covalentemente em posições pré-determinadas, numa placa de vidro, numa célula de fluxo. O primer, a polimerase e os nucleótidos marcados são então adicionados ao suporte de vidro (Ansorge, 2009).

A próxima base incorporada na cadeia sintetizada é determinada através da emissão de um sinal, sob a forma de luz, emitida por fluorescência na sequência, através da técnica de síntese. Este sistema também permite analisar milhares de fragmentos únicos de DNA simultaneamente, permitindo sequenciar até 28 Gb numa única corrida de sequenciação num processo que de princípio ao fim demora apenas cerca de oito dias (Ansorge, 2009). Permite executar leituras com um comprimento máximo de 55 bases (Pareek *et al.*, 2011).

4.5.3.3. Ion Proton

O sequenciador Ion Torrent's é um chip de sílica, concebido da mesma forma que um semicondutor e gravado com uma série de poços nanoscópicos (~400) da largura de um fio de cabelo (Island, 2010).

Os poços situam-se na parte superior da camada iónica sensível e na base existe um medidor de pH, que é a camada que transmite a corrente elétrica. Em cada poço está imobilizada uma polimerase, a qual fixa o DNA que vai ser decifrado. Cada uma das quatro bases é adicionada em tempos diferentes. Quando o nucleótido necessário para a continuação da síntese fica acessível à DNA polimerase, esta incorpora-o na cadeia de DNA nascente libertando-se um hidrogénio que o chip deteta como uma alteração da voltagem. Se o nucleótido adicionado não corresponder ao próximo nucleótido a ser incorporado, a polimerase não o utiliza e não se verifica mudança da voltagem (Island, 2010).

A séries de pulsos elétricos registados pelo chip traduzem uma leitura do DNA que está a ser sequenciado.

Esta técnica é extremamente promissora, podendo em teoria sequenciar a totalidade de uma molécula de DNA, em extensões muito superiores às técnicas anteriormente descritas. Tal já foi demonstrado em aplicações práticas, embora limitadas à sequenciação de genomas de vírus e bactérias (Island, 2010).

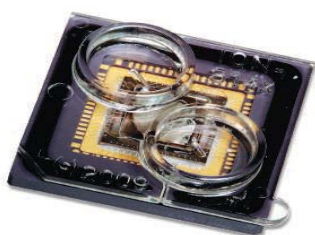


Figura 8. Sequenciador de sílica. Ion Torrent chip que descodifica o DNA através da deteção da alteração da voltagem (Island, 2010).

4.5.3.4. Nanopore sequencing

As nanotecnologias têm sido consideradas como as tecnologias de topo para a sequenciação de uma única molécula de DNA. Atualmente estão a ser desenvolvidos vários conceitos e tecnologias baseados na sequenciação utilizando diversos nano poros (Zhang *et alli.*, 2011).

A sequenciação de uma molécula de DNA, utilizando um sequenciador de DNA Nanopore não exige a marcação de nucleótidos para a sua deteção. Esta técnica foi desenvolvida a partir de estudos de translocação do DNA através de vários nano poros artificiais ou proteicos. A sequenciação de DNA com o instrumento Nanopore baseia-se na conversão da perturbação do sinal elétrico que percorre um nano poro, quando este é atravessado por um nucleótido. No sistema desenvolvido pela Oxford Nanopore, o nano poro consiste num poro proteico de α -hemolisina, o qual se liga covalentemente a uma molécula de ciclodextrina (local de ligação para os nucleótidos) (Pareek *et al.*, 2011).

O princípio da técnica assenta na modulação da corrente iónica que atravessa o poro, revelando parâmetros da molécula de DNA, como por exemplo a sua conformação, comprimento e diâmetro. Durante o processo da sequenciação, a corrente iónica que atravessa o nano poro é bloqueada por um nucleótido. O período de tempo deste bloqueio é característico de cada base permitindo assim determinar a sequência de DNA (Pareek *et al.*, 2011).

Dois sistemas estão a ser desenvolvidos pela Oxford Nanopore. Num toda a cadeia de DNA molde é forçada a passar pelo nano poro, sendo uma polimerase acoplada ao poro a força motriz que força os nucleótidos um a um, em sequência e sem desagregação da cadeia a passar pelo nano poro. Num segundo processo (a única reação de sequenciação por hidrólise hoje em desenvolvimento), uma exonuclease degrada sequencialmente o DNA a sequenciar, sendo a própria diferença de potencial que atravessa o poro a força motriz que obriga os nucleótidos libertados a atravessar um a um o poro (Graham-Rowe, 2012).



Figura 9. Representação do sistema MinION. Dispositivo sequenciador de DNA do tamanho de uma pen USB portátil e descartável (Graham-Rowe, 2012).

4.5.4. Aplicações da Sequenciação à detecção e caracterização de genomas

4.5.4.1. Sequenciação do gene rRNA 16S

Durante muitos anos a sequenciação do gene 16S RNA ribossomal (rRNA) funcionou como uma importante ferramenta para determinar as relações filogenéticas entre bactérias (Patel, 2001).

Para além desta função, o gene 16S rRNA reúne um conjunto de características que permitem a identificação de bactérias no âmbito clínico.

A identificação bacteriana através da sequenciação do gene 16S rRNA é um método universal, uma vez que este gene está presente em todas as bactérias (Patel, 2001).

A análise da sequenciação do gene 16S rRNA constitui um poderoso mecanismo para a identificação de novos agentes patogénicos em pacientes com suspeita de doença bacteriana (Patel, 2001).

Mais recentemente, a amplificação e a sequenciação do gene 16S rRNA tem sido aplicadas para detetar e identificar patogénicos bacterianos fastidiosos como é o exemplo do *Tropheryma whippelii* (agente da doença de Whippelii) e da *Bartonella quintana* (agente da angiomatose bacilar) (Patel, 2001).

Para além do gene 16S rRNA estar presente em todas as bactérias, permitindo assim a sua identificação, apresenta outras características que fazem dele uma ferramenta

importante com bastante utilidade. Ao longo dos anos verificou-se que o gene 16S rRNA permaneceu constante, refletindo apenas alterações aleatórias que pouco alteram a função da molécula (Patel, 2001).

Por último, este gene é suficientemente grande (cerca de 1000 pb) para conter informações estatisticamente relevantes da sequência, embora seja mais importante ainda a composição da molécula (composta por cerca de 50 domínios funcionais). O número de domínios é relevante porque a introdução de mudanças num domínio não afeta significativamente as sequências dos restantes domínios. Assim sendo à medida que o número de domínios aumenta, menos impacto irá ter nas relações filogenéticas.

Woese definiu estas características como cronómetros moleculares, moléculas cuja sequência se altera aleatoriamente ao longo do tempo (Patel, 2001).

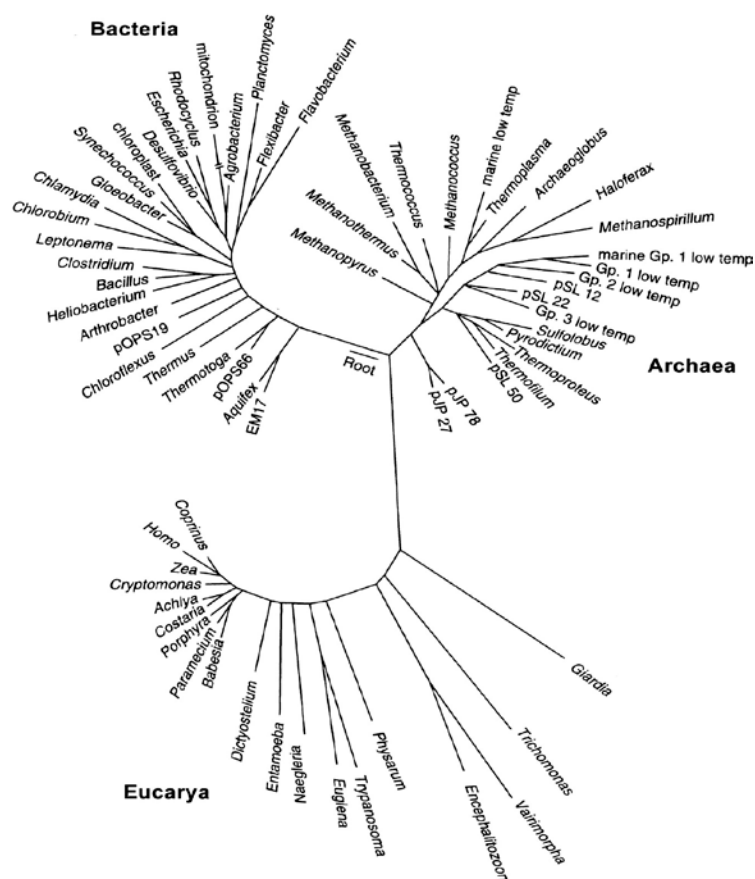


Figura 10. Esquema representativo da árvore filogenética universal com base na comparação das sequências do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004).

4.5.4.2. DNA Barcoding

O projeto DNA barcoding foi inicialmente concebido como um sistema padrão para uma rápida e precisa identificação de espécies animais (Frézal & Leblois, 2008).

O “código de barras” de DNA consiste numa região de 648 bp, a partir de uma extremidade 5’ de citocromo c oxidase I (COI), que utiliza o genoma mitocondrial de um rato como referência.

A base deste projeto assenta no postulado de que todas as espécies, provavelmente, têm um único “código de barras” de DNA e que a variação genética entre espécies diferentes ultrapassa a variação que existe dentro da mesma espécie (Frézal & Leblois, 2008).

Os principais objetivos do DNA barcoding são atribuir nomenclatura a espécies desconhecidas, melhorar a descoberta de novas espécies e facilitar a identificação de microrganismos e de organismos com morfologias mais complexas (Frézal & Leblois, 2008).

O custo e o tempo efetivo gasto na análise do DNA barcoding permitem a identificação automatizada de espécies, principalmente em amostras de grande volume. Deste modo esta técnica permite melhorar as pesquisas de espécies patogénicas que apresentam relevância médica, ecológica ou até mesmo agronómica (Frézal & Leblois, 2008).

Uma vantagem do DNA barcoding é a rápida aquisição de dados moleculares. Em contrapartida, a recolha dos dados morfológicos pode ser demorada ou até mesmo impossível.

Este projeto tem a finalidade de uma rápida montagem de uma biblioteca representativa que sirva de referência, assim utiliza protocolos de baixo custo para a extração, amplificação e sequenciação do DNA (Frézal & Leblois, 2008).

4.5.4.3. Metagenómica

A genómica consiste no estudo sistemático à escala de um genoma inteiro, para a identificação das contribuições genéticas para a fisiologia do organismo em estudo (Zhang *et alli.*, 2011). Este conceito foi, mais recentemente, alargado com expressão inventada pelo ecologista Jo Handelsman em 1998 (Metagenómica). Este termo refere-se ao estudo dos conteúdos genómicos de microrganismos extraídos diretamente do ambiente (Williamson, 2011), este conceito foi posteriormente alargado para incluir os

estudos de culturas independentes, de um conjunto de genomas de uma comunidade microbiana heterogénea (Petrosino *et alli.*, 2009).

Assim, a metagenómica é hoje uma peça fundamental na análise de populações de microrganismos (Handelsman, 2004), podendo ser aplicada ao estudo de todos os genomas microbianos em associação, que habitam em nichos ecológicos ambientais, em plantas ou em hospedeiros animais (Petrosino *et alli.*, 2009). O mesmo se passa no estudo de comunidades virais. No entanto neste caso, as maiores dificuldades de cultura e caracterização fenotípica aliada à maior simplicidade genómica dos vírus quando comparados com as bactérias e fungos tornam estes métodos particularmente importantes na caracterização de comunidades virais e sua identificação como agentes patogénicos. Neste contexto, é particularmente interessante o facto de as amostras a analisar em metagenómica poderem ser obtidas diretamente das amostras ambientais/clínicas diretamente sequenciadas sem necessidade de qualquer cultura (Yang *et alli.*, 2011). Os estudos já desenvolvidos fazem uso das técnicas de sequenciação mais recentes, e o enorme volume de dados daí resultantes promete revolucionar o nosso entendimento acerca de muitos genes ou regiões genómicas responsáveis pela patogénese de doenças Humanas (Zhang *et alli.*, 2011).

PARTE III - CONCLUSÃO

5. Conclusão

A realização deste projeto teve como base principal a pesquisa bibliográfica sobre os diferentes métodos moleculares, baseados na tecnologia dos ácidos nucleicos, que visam detetar e identificar de uma forma rápida e eficaz diversos tipos de microrganismos.

Este trabalho inicia com uma breve perspectiva da história do início da microbiologia, dos diferentes tipos de agentes patogénicos e respetivas infeções patogénicas humanas. Daqui se depreende que a microbiologia é uma área em permanente desenvolvimento. Ao longo dos anos os investigadores têm procurado desenvolver novos métodos de diagnóstico, desde os métodos mais clássicos até aos mais sofisticados. Com o aperfeiçoamento dos métodos já existentes, surgem novas técnicas automatizadas que permitem analisar um vasto leque de microrganismos em pouco tempo. Assim surgem os sistemas multiplex vão desde a PCR Multiplex até às diferentes técnicas de sequenciação do DNA à escala nanoscópica. Com o emergir das tecnologias multiplex, é possível detetar e identificar milhões de genes simultaneamente e num curto espaço de tempo, reduzindo a probabilidade de desenvolver determinada doença ou até mesmo possibilitar o descobrimento de novas patologias.

Inicialmente, os meios disponíveis para avançar em termos científicos eram relativamente deficientes. As primeiras técnicas para identificar bactérias bem como outros microrganismos eram muito rudimentares com recurso a métodos manuais que exigiam grandes períodos de tempo de espera entre a análise e os resultados obtidos. Esses métodos primordiais, para além de bastante demorados não permitiam identificar e classificar um grande número de espécies.

Atualmente, e cada vez mais, se investe nas áreas da genética e da microbiologia que em associação reforçam a probabilidade de satisfazer alguns contratempos que se sobrepõem aos métodos tradicionais. Assim sendo, hoje em dia, recorrendo a diferentes técnicas de sequenciação, já é possível analisar até centenas de milhares de sequências de DNA, que permitem caracterizar ecossistemas completos, em simultâneo e num curto espaço de tempo.

Mais recentemente, a metagenômica constitui uma área relativamente nova que promete revolucionar toda a ciência, possibilitando o conhecimento de genes que causam doença no Homem.

Novas tecnologias genômicas têm vindo a revolucionar a nossa compreensão relativamente aos genes e a regiões genômicas envolvidas na patogénese de doenças humanas.

Em conclusão, a ciência não é estanque. Como podemos observar diariamente, através dos diversos meios de comunicação, todas as áreas científicas estão em permanente desenvolvimento e não há qualquer dúvida que num futuro próximo o expoente progresso da genómica poderá conduzir eventualmente ao nascimento da medicina genética que irá com certeza impulsionar avanços e melhorias significativas na saúde humana.

PARTE IV - BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

- Albuquerque D.M., Costa S.C.B. (2003). Genotyping of human cytomegalovirus using non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Journal of Virological Methods*. 110, pp. 25-28.
- Ansorge W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 25(4).
- Applied Biosystems. (2008). SOLiD System Accuracy.
- Athanasiou T., Debas H.T., Darzi A. (2010). Key Topics in Surgical Research Methodology. (Berlim). *Springer*. pp. 964-968.
- BioRad. (1996). DCode Universal Mutation Detection System.
- Bosson G. (2002). Denaturing HPLC: the tool of choice for detecting single nucleotide polymorphisms. *Biomedical Scientist*. pp. 1269-1273.
- Brachman, P.S. (1996). Medical Microbiology. Galveston. Samuel Baron 4th edition.
- Briese T., Brand T., Renwick N., Kapoor V., Villari J., Palacios G., Liu Z., Jabado O., Postl D., Royce S., Casas I., Schweiger B., Lipkin W.I. (2007). Mass Tag PCR – A Multiplex System for Differential Pathogen Detection Using Single Quadrupole MS. (MPT). America Society of Mass Spectroscopy Meeting (Poster in MPT 326) Indiana, USA.
- Briese T., Palacios G., Kokoris M., Jabado O., Liu Z., Renwick N., Kappor V., Casas I., Pozo F., Limberger R., Perez-Brena P., Ju J., Lipkin I. (2005). Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 11(2), pp. 310-313.
- Brown T. (2003). Southern Blotting in Taylor G.P (Eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
- Cabeda J.M.B., Estevinho A., Amorim M.L. (1999). *Sebenta do curso de Biologia Molecular da Escola Superior de Tecnologia de Saúde do Porto*.
- Cabeda J.M. *et al.* (2012). *A Genética Molecular na Investigação e Prática Clínicas: Fundamentos Teóricos e Tecnológicos* (manuscrito em preparação).
- Clarridge J.E. (2004). Impacto f 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(4), pp. 840-862.
- Cuzin M. (2001). DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol*. 8, pp. 291-6.

- Deiman B., van Aarle P., Sillekens P. (2002). Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology* . 20(2), pp.163-179.
- Dong Y., Zhu H. (2005). Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and practice. *Methods Mol Med*. 108, pp.149-57.
- Dunbar S.A. (2005). Applications of Luminex xMap technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta*.
- Fard-Esfahani P., Khatami S., Zeinali C., Taghikhani M., Allahyari M. (2005). A modified conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) method for rapid and accurate detection of low density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations in Familial Hypercholesterolemia. *Clinical Biochemistry*. 38(6), pp. 579-583.
- Fernandes, W., Lima, N., Sousa J.C. (2010). Microbiologia. (Lisboa). *Lidel*.
- Ferreira, W., Sousa, J.C. (1998). Microbiologia. (Lisboa). *Lidel*.
- Ferreira, W., Sousa, J.C. (2000). Microbiologia. (Lisboa). *Lidel*.
- Frézal L., Leblois R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*. 8(5), pp.727-736.
- GenProbe. (2000). New directions in Molecular Diagnostic Testing: An educational guide for clinical laboratory professionals.
- Gingeras T.R., Higuchi R., Kricka L.J., Lo Y.M.D., Wittwer C.T. (2005). Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clinical Chemistry*. 51(3), pp. 661-671.
- Graham-Rowe. (2012). D. USB stick can sequence DNA in seconds. *New Scientist*. 2853, pp. 23-24.
- Handelsman J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4) pp. 669-685.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*. (6), pp. 986-994.
- Hirata M.H, Tavares V., Hirata R.D.C. (2006). Da Biologia Molecular à Medicina: Métodos Comumente utilizados em Farmacogenética. *Medicina*. 39(4), pp. 522-34.
- Hunkapiller T., Kaiser R.J., Koop B.F, Hood L. (1991). Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*. 254(5028), pp. 59-67.
- Hurtle W., Shoemaker D., Henchal E., Norwood D. (2002). Denaturing HPLC for Identifying Bacteria. *Biotechniques*. 33, pp. 386-391.
- Imelfort M., Edwards D. (2009). De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*. 10(6), pp. 609-618.

- Island M. (2010). Semiconductors Inspire New Sequencing Technologies. (Florida). *Science*. 327.
- Kafatos, F.C., Jones, C.W., Efstratiadis, A. (1979). Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Research*. 7(6), pp. 1541-1552.
- Kawasaki E.S. (1990). Amplification of RNA in Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds) PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc (New York).
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Farootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 27(2-3), pp. 95-125.
- Landegren, U. (1996). Laboratory protocols for mutation detection. *HUGO*.
- Lee I., Shin S., Zhang B. (2007). Multiplex PCR assay design by hybrid multiobjective evolutionary algorithm. (Korea). *Computer Science*. pp. 376-385.
- Loens K., Ursi D., Goossens H., Ievon M. (2005). Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Medical Biomethods Handbook*. pp. 273-291.
- Lou X.J., Panaro N.J., Wilding P., Fortina P., Kricka L.J. (2004). Mutation detection using ligase chain reaction in passivated silicon-glass microchip capillary electrophoresis. *BioTechniques*. 37, pp. 392-398.
- Mardis E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 24(3), pp. 133-141.
- Maxam A.M, Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Biochemistry*. 74(2), pp. 560-564.
- Mendes A.C.P. (2008). Detecção de DNA microbiano em amostras clínicas e culturas bacterianas. Tese de Mestrado da Universidade de Aveiro.
- Mothershed, A.E., Whitney, M.A. (2005). Nucleic acid-based methods for detection of bacterial pathogens: present and future considerations for clinical laboratory: A review. *Clinica Chimica Acta*. 363, pp. 206-220.
- Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genetics*. 52(4), pp.413-435.
- Patel J.B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen: identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*. 6(4), pp. 313-321.
- Persing D.H, Smith T.F, Tenover F.C, White T.J. (1993). Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Maya Foundation.
- Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. 55(5), pp. 856-866.

- Roche Molecular Systems (2003). The evolution of PCR.
- Ronaghi M. (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, pp. 3-11.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc NATL Acad Sci* . 74(12), pp. 5463-5467.
- Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. (2010). A window into third generation sequencing. *Human Molecular Genetics.* 19(2), pp. 227-240.
- Shendure J.A, Porreca G.J, Church G.M. (2008). Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Bio.*
- Spielgeman, J. I., Mindrinos, M.N., Oefner, P.J. (2000). High-Accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques.* 29, pp. 1084-1092.
- Tchernitchko D., Lamoril J., Puy H., Robreau A.M., Bogard C., Rosipal R., Gouya L., Deybach J.C., Nordmann Y. (1999). Evolution of mutation screening by heteroduplex analysis in acute intermittent porphyria: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta.* 279(1-2), pp. 133-143.
- Tian H., Brody L., Landers J.P. (2000). Rapid detection of deletion, insertion and substitution mutations via Heteroduplex Analysis using capillary and Microchip based electrophoresis. *Genome Res.* 10, pp. 1403-1413.
- Tokarz R., Kapoor V., Samuel J.E., Bouyer D.H., Briese T., Lipkin W.I. (2009). Detection of tick-borne pathogens by Mass Tag Polymerase Chain Reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(2), pp.147-151.
- Vandesompele J.O., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Palpe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric overaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7):research 0034.I-0034.II.
- Visser M.R., Fluit A.C. (1995). Amplification methods for detection of bacterial resistance genes, *Journal of Microbiological Methods.* 23, pp. 105-116.
- Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., Malinowski D.P. (1992). Strand Displacement Amplification: an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research.* 20(7), pp.1691-1696.
- Williamson S.J. (2011). Viral metagenomics. Handbook of molecular microbial ecology II: Metagenomics in different habitats.
- Yang J., Yang F., Ren L., Xiong Z., Wu Z., Dong J., Sun L., Ting Z., Hu Y., Du J., Wang J., Jin Q. (2011). Unbiased parallel detection of viral pathogens in clinical samples by use of a metagenomic approach. *Journal of Clinical Microbiolgy.* 49(10), pp. 3463-3469.
- Zhang J., Chiodini R., Badr A., Zhang G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics.* 38, pp. 95-109.

