

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Pedro Miguel Nisa Costa**

# **Diagnóstico Molecular da Tuberculose Bovina**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Doutor João Inácio Silva  
(LNIV – INRB, I. P.)

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Pedro Viana Baptista  
(DCV, FCT/UNL)

**LISBOA**

**2009**

**nº de arquivo**

**“Copyright”**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Pedro Miguel Nisa Costa**

# **Diagnóstico Molecular da Tuberculose Bovina**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Doutor João Inácio Silva  
(LNIV – INRB, I. P.)

**Co-orientador:**

Prof. Doutor Pedro Viana Baptista  
(DCV, FCT/UNL)

**LISBOA**

**2009**

## **Agradecimentos**

É com grande satisfação que expresso aqui o meu sincero agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar ao Doutor João Inácio e Professor Doutor Pedro Baptista, orientadores da presente investigação, pelo empenho e disponibilidade demonstrados desde o início deste projecto, e pela excelência da orientação científica, factores imprescindíveis para a realização do mesmo.

À Ana Amaro, Ana Botelho, Helena Ferronha e Ivone Correia, pelo interesse, contributos, comentários, sugestões fornecidas para o desenvolvimento deste projecto e apoio demonstrado ao longo da dissertação.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante este processo. Colegas de Mestrado e em especial, aos colegas do laboratório 315 pelo apoio fundamental e pelo convívio.

À minha família, que tanto apoio, paciência e compreensão demonstraram durante todos os altos e baixos deste processo.

Por fim, mas não menos importante, à Diana, pelo apoio incondicional, motivação e compreensão.

Sem eles não teria sido possível, nem me daria tanta satisfação estar a escrever estas linhas.

São aqueles a quem desejo agradecer particularmente entre tantos, pois espero que saibam o que significa o apoio que me têm dado.

## Sumário

A tuberculose bovina é uma importante doença animal com elevado impacto económico. O agente etiológico desta doença é a bactéria *Mycobacterium bovis* que, para além de afectar bovinos, causa também tuberculose noutras espécies de mamíferos, incluindo o Homem. Esta micobactéria pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) que inclui espécies filogeneticamente muito próximas, nomeadamente *M. tuberculosis* - principal agente da tuberculose humana, e *M. caprae* - associado a tuberculose em caprinos.

Os métodos de diagnóstico convencional da tuberculose não diferenciam entre as várias espécies do MTC, cuja discriminação é normalmente apenas possível com recurso ao diagnóstico molecular, nomeadamente à análise de polimorfismos do gene *gyrB*. Recentemente, têm sido descritas várias Regiões de Diferença (RDs) no genoma destas espécies cuja análise se apresenta como alternativa fiável para a sua identificação.

Realizou-se neste trabalho um estudo comparativo *in silico* que permitiu desenhar conjuntos de *primers* para analisar a presença ou ausência de determinadas RDs nas espécies do MTC. Esta abordagem possibilitou uma fácil e rápida discriminação entre estas espécies.

Paralelamente, recorreu-se a nanossondas de ouro coloidal para identificar os principais membros do MTC tendo como alvo o gene *gyrB*. Foram desenhadas três nanossondas - uma para identificação do complexo, uma específica para *M. bovis* e outra para *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de utilização desta abordagem na identificação específica de membros do MTC.

Palavras-chave: Tuberculose bovina; Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; Nanossondas de ouro

## Abstract

Bovine tuberculosis is a major animal disease with high economic impact. The etiologic agent of this disease is the bacterium *Mycobacterium bovis*, which, besides affecting cattle, also causes tuberculosis in other mammalian species, including humans. This mycobacterium belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), which includes species phylogenetically very close, particularly *M. tuberculosis* - main agent of human tuberculosis, and *M. caprae* - associated with tuberculosis in goats.

The conventional methods of diagnosis of tuberculosis does not differentiate between the various species of the MTC, the discrimination is only possible using molecular diagnosis, e.g. analysis of polymorphisms of the *gyrB* gene distinguishes between key members of the MTC. Recently, several Regions of Difference (RDs) have been described in the genome of these species whose analysis is presented as a reliable alternative for identification.

An *in silico* comparative study has been done allowing design sets of primers to analyze the presence or absence of RDs in certain species of the MTC. This approach allowed the easy and quick discrimination between these species.

In parallel, were used colloidal gold nanoprobe to identify key members of the MTC, using as a target the *gyrB* gene. Three nanoprobe were designed - one for identification of the complex, one specific for *M. tuberculosis* and one specific for *M. bovis*. The results indicate the possibility of using this approach in identifying specific members of the MTC.

Keywords: Bovine tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis* complex; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; Gold nanoprobe

## Lista de abreviaturas

<b>Ag</b>	Prata
<b>Au</b>	Ouro
<b>AuNPs</b>	Nanopartículas de ouro
<b>BAAR</b>	Bacilos Álcool-ácido Resistentes
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>DGS</b>	Direcção Geral de Saúde
<b>DGV</b>	Direcção Geral de Veterinária
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DR</b>	<i>Direct Repeats</i>
<b>ESAT-6</b>	<i>6 kDa early secretory antigenic target</i>
<b>GC</b>	Guanina e Citosina
<b><i>gyrB</i></b>	Gene codificante para a subunidade B da girase do DNA
<b>IVD</b>	<i>In Vitro Diagnostics</i>
<b>LPS</b>	<i>Large Sequence Polymorphisms</i>
<b><i>M.</i></b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>MAC</b>	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
<b>MTC</b>	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OIE</b>	World Organisation for Animal Health
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase
<b>Pt</b>	Platina
<b>RDs</b>	Regiões de Diferença
<b>RFLP</b>	Polimorfismos dos fragmentos de restrição do DNA genómico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SNPs</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<b>SPR</b>	Ressonância do plasmão de superfície
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde

## Índice de matérias

Agradecimentos .....	i
Sumário.....	ii
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas .....	iv
1. Introdução .....	1
1.1. O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	2
1.2. A tuberculose bovina .....	7
1.3. Diagnóstico da tuberculose bovina .....	9
1.3.1. Métodos convencionais de diagnóstico.....	9
1.3.2. Métodos moleculares de diagnóstico .....	10
1.4. Nanotecnologia e nanodiagnóstico .....	12
1.5. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação .....	15
2. Materiais e métodos.....	16
2.1. Entidades.....	16
2.2. Estirpes analisadas e extracção de DNA.....	16
2.3. Desenho de <i>primers</i> e sondas de DNA .....	17
2.4. Amplificação do gene <i>gyrB</i> por PCR .....	20
2.5. Amplificação das Regiões de Diferença por PCR .....	20
2.6. Visualização dos produtos de amplificação.....	20
2.7. Síntese das nanopartículas de ouro .....	21
2.8. Síntese de nanossondas de ouro.....	21
2.9. Detecção colorimétrica de fragmentos de DNA com nanossondas de ouro.....	22
3. Resultados e discussão .....	24
3.1. Amplificação do gene <i>gyrB</i> por PCR .....	24
3.2. Análise dos padrões de presença/ausência das Regiões de Diferença.....	27
3.3. Diferenciação dos membros do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com nanossondas de ouro coloidal .....	31
3.4. Análise da estirpe <i>Mycobacterium caprae</i> LNIV 20752 .....	41

3.5. Sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares estudados .....	43
4. Considerações finais .....	45
5. Referências bibliográficas .....	48

Do trabalho desenvolvido resultaram as seguintes publicações:

Revistas internacionais com arbitragem científica

- **Costa P.**, Amaro A., Botelho A., Inácio J., Baptista P. 2009. Gold nanoprobess assay for identification of mycobacteria from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clinical Microbiology and Infection* (*aceite para publicação*)

Resumos em actas de encontros científicos nacionais e internacionais

- **Costa P.**, Baptista P., Amaro A., Botelho A., Inácio J. 2009. Diagnóstico molecular da tuberculose bovina, 1º Encontro Parcerias para a Investigação UP/LNIV, Vairão, Portugal.
- **Costa P.**, Baptista P., Amaro A., Botelho A., Inácio J. 2009. Identification of *Mycobacterium bovis* and other *M. tuberculosis* complex members using species-specific gold nanoprobess. 5<sup>th</sup> Med-Vet-Net Meeting, El Escorial, Madrid, Espanha.
- Botelho A., Albuquerque T., Amaro A., **Costa P.**, Domingos M., Duarte E., Ferronha H., Inácio J., Matos F., Amado A. 2009. Molecular identification and typing of *Mycobacterium bovis*: LNIV developments in the five years VENoMYC period. Final General Meeting of VENoMYC European Project, Turim, Itália.
- **Costa P.**, Inácio J., Amaro A., Botelho A., Baptista P. 2009. Gold nanoprobess – A new approach to differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* complex members. Microbiotec09, 29-30 Novembro 2009, Vilamoura, Portugal.

## 1. Introdução

A tuberculose é uma grave doença epidémica e infecto-contagiosa a nível global, responsável pela morte de aproximadamente dois milhões de pessoas por ano, estimando-se que um terço da população mundial esteja infectada de forma latente (Etter *et al.*, 2006). Apesar de curável, a tuberculose é ainda em muitos países a principal causa de morte no Homem, registando-se um aumento do número de casos de pessoas infectadas em muitas regiões do globo. Esta doença representa assim, ainda, um grave problema de saúde pública (Etter *et al.*, 2006). De acordo com os dados da Direcção Geral de Saúde (DGS), em Portugal, em 2008 foram diagnosticados 2916 casos de tuberculose. Os esforços feitos no sentido de atenuação e prevenção desta doença em Portugal resultaram na diminuição significativa dos casos registados nas duas últimas décadas.

Sendo uma das doenças infecciosas documentadas desde mais longa data, apenas em 1882 foi descoberto o bacilo de Koch, o principal agente etiológico da tuberculose (Zink *et al.*, 2007). Sabe-se hoje que esta doença é provocada por vários membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), um grupo de espécies filogeneticamente muito próximas, entre elas, nomeadamente: *M. tuberculosis*, o principal agente da tuberculose humana; *M. bovis* e *M. caprae*, mais associados a tuberculose em bovinos e caprinos, respectivamente; *M. africanum*; e *M. microti* (Brosch *et al.*, 2002). No género *Mycobacterium*, além de *M. tuberculosis*, reconhecem-se cerca de 120 outras espécies, entre as quais pelo menos 20 a 30 podem causar doença no homem (Smith *et al.*, 2009) (Tabela 1.1).

A tuberculose tem apresentado constantemente novos desafios nas áreas da Medicina e Microbiologia, nomeadamente respeitantes ao seu diagnóstico e profilaxia. Mais recentemente, com a sequenciação dos genomas de *Mycobacterium tuberculosis* e de outros membros do MTC, surgem novas oportunidades para um diagnóstico e tratamento mais eficientes desta doença.

**Tabela 1.1.** Classificação clínico-patológica das micobactérias mais frequentes em Medicina Humana

Classificação	Espécie
Estritamente patogénicos, ou patogénicos estritos	<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. bovis</i> ; <i>M. africanum</i> ; <i>M. leprae</i> ; <i>M. ulcerans</i> ; <i>M. szulgai</i> ; <i>M. marinum</i> .
Potencialmente patogénicos, ou oportunistas	<i>M. avium</i> ; <i>M. intracellulare</i> ; <i>M. scrofulaceum</i> ; <i>M. kansasii</i> ; <i>M. xenopi</i> ; <i>M. haemophilum</i> ; <i>M. genavense</i> ; <i>M. simiae</i> ; <i>M. malmoense</i> .
Raramente patogénicos, comensais ou saprófitas	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. peregrinum</i> ; <i>M. chelonae</i> ; <i>M. abscessus</i> ; <i>M. thermoresistibile</i> ; <i>M. gordonae</i> ; <i>M. triviale</i> ; <i>M. gastri</i> ; <i>M. terrae</i> ; <i>M. flavescens</i> ; entre outras...

### 1.1. O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O género *Mycobacterium* é um dos géneros bacterianos descritos há mais tempo, pertence à família Mycobacteriaceae da ordem Actinomycetales e inclui mais de 120 espécies validamente descritas (Smith *et al.*, 2009). São bactérias Gram-positivas, com forma de bastonete, aeróbias, imóveis e não esporuladas. A sua temperatura óptima de crescimento varia entre os 30 °C e 45 °C (Rastogi e Sola, 2001). A característica mais peculiar do género consiste na complexidade da sua parede celular, única entre os procariontes, constituída por uma elevada percentagem de lípidos, que incluem ácidos micólicos de 60 a 90 carbonos (Takayama *et al.*, 2005).

As espécies de *Mycobacterium* agentes de tuberculose agrupam-se no chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), cujos membros partilham cerca de 99,95% de homologia de sequências ao nível nucleotídico (Sreevatsan *et al.*, 1997; Mostowy *et al.*, 2005). O MTC é assim constituído por várias espécies e subespécies com importância clínica humana e veterinária: *Mycobacterium canettii*; *Mycobacterium africanum*; *Mycobacterium pinnipedii*; *Mycobacterium microti*; *Mycobacterium caprae*; *Mycobacterium bovis*; e *Mycobacterium tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 1997; Aranaz *et al.*, 2003; Cousins *et al.*, 2003). Há no entanto que realçar que a comunidade científica ainda não chegou a um consenso sólido

relativamente ao número de espécies que efectivamente constituem o complexo. Por exemplo, alguns autores defendem que a estirpe vacinal, *M. bovis* BCG, é uma subespécie de *M. bovis*, enquanto outros classificam *M. bovis* BCG como uma espécie filogeneticamente próxima, mas distinta.

Todos os membros do MTC têm preferência por determinado hospedeiro. Por exemplo, *M. tuberculosis*, o principal agente da tuberculose humana, está quase sempre associado ao humano. Já os representantes de *M. bovis* são encontrados principalmente associados aos bovinos, *M. caprae* aos caprinos e *M. pinnipedii* aos mamíferos marinhos (Brosch *et al.*, 2000). Contudo, a adaptação destas espécies a cada hospedeiro não é necessariamente estrita como o é para outras bactérias patogénicas. Todos os membros do MTC podem causar doença em humanos e noutros mamíferos que não eram inicialmente considerados como hospedeiros primários (Tabela 1.2) (Smith *et al.*, 2009). É de realçar que *M. bovis* e *M. caprae* representam um elevado potencial zoonótico de transmissão ao Homem (Kubica *et al.* 2003; Thoen *et al.* 2006). Existem evidências que apontam para a possibilidade de transmissão pessoa-a-pessoa das espécies zoonóticas de *Mycobacterium* (Evans *et al.*, 2007), mas as principais vias de transmissão são o contacto com animais infectados e a ingestão de lacticínios incorrectamente pasteurizados ou não pasteurizados (O'Reilly e Daborn 1995; Etter *et al.*, 2006).

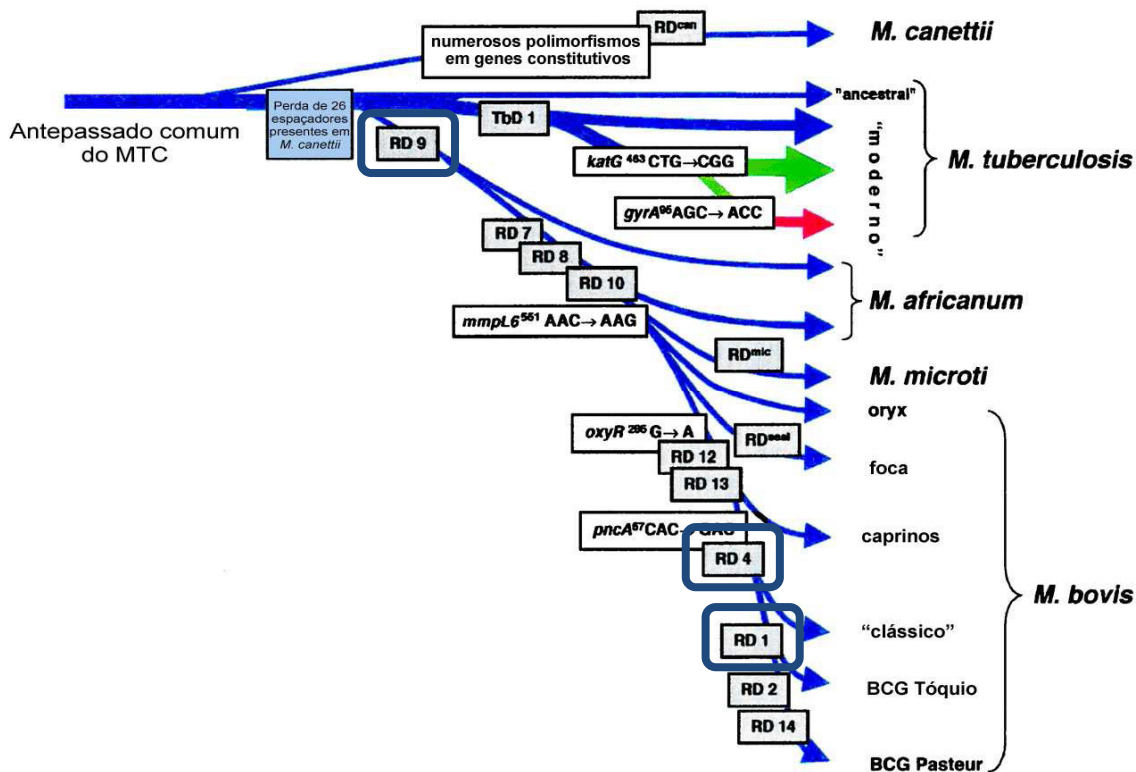
O genoma dos membros do MTC é mais extenso relativamente ao de outros microrganismos intracelulares, com aproximadamente 4,4 milhões de pares de bases. Este genoma contém ainda um elevado conteúdo em GC, de 65%. A troca de material genético, como por exemplo a transferência horizontal de genes, é praticamente inexistente nestas espécies o que se traduz numa evolução maioritariamente clonal, assentando em deleções de sequências nucleotídicas extensas (LPS, do Inglês *Large Sequence Polymorphisms*), rearranjos e mutações pontuais no cromossoma (Brosch *et al.*, 2002; Springer *et al.*, 2004). Como foi referido anteriormente, os membros do MTC são caracterizados por possuírem 99,95% de semelhança entre eles, com uma muito reduzida diversidade genética ao nível nucleotídico (Sreevatsan *et al.*, 1997). Apesar do elevado grau de conservação dos seus genomas, as espécies do MTC demonstram importantes diferenças fenotípicas, adaptações a diferentes hospedeiros e evidenciam diferentes graus de virulência para o Homem (Brosch *et al.*, 2000).

**Tabela 1.2.** Espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e respectivos hospedeiros

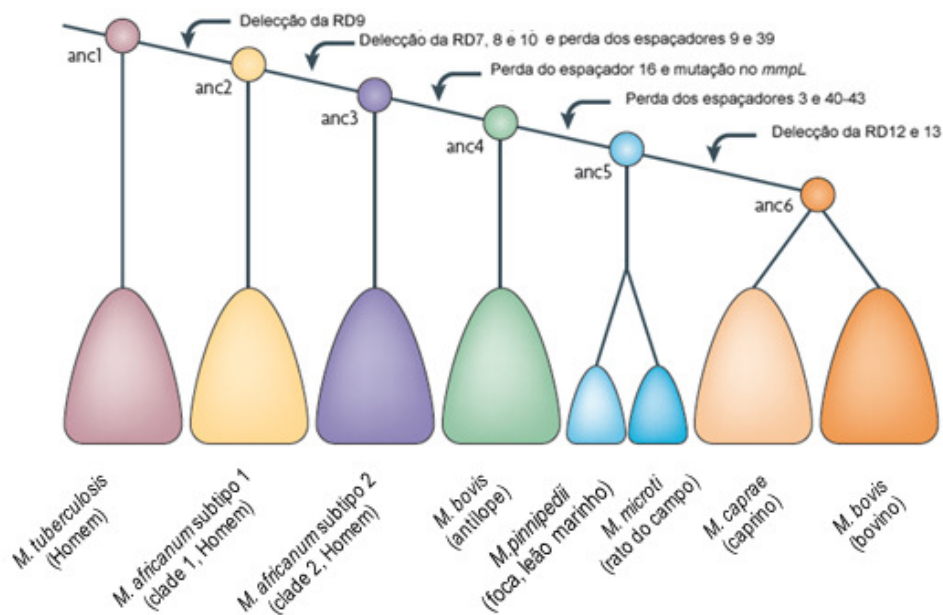
<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro primário</b>	<b>Outros hospedeiros</b>	<b>Características</b>
<i>M. tuberculosis</i>	Humano	Outros mamíferos	Espécie quase exclusiva do Humano, contudo existem registos de infecções noutros mamíferos (Montali <i>et al.</i> , 2001; Michel <i>et al.</i> , 2003; Lewerin <i>et al.</i> , 2005; Amado <i>et al.</i> , 2006).
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Ovinos, caprinos, caninos, felinos e Humano	Espécie com maior número de possibilidades de hospedeiros (Liebana <i>et al.</i> , 1997; Rastogi e Sola, 2001; Malone <i>et al.</i> , 2003; Ellis <i>et al.</i> , 2006; Monies <i>et al.</i> , 2006).
<i>M. caprae</i>	Caprinos	Humano	Foi considerada uma subespécie de <i>M. bovis</i> , mas as diferenças genéticas levaram a que fosse considerada uma espécie distinta (Aranaz <i>et al.</i> , 1999).
<i>M. africanum</i>	Humano	-	Espécie fenotipicamente intermédia entre <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> e cuja área de incidência se restringe quase exclusivamente ao continente Africano. Estão descritas duas variedades (Haas <i>et al.</i> , 1997).
<i>M. microti</i>	Roedores	Humano	Grau de patogenicidade inferior aos das restantes espécies, sendo uma potencial substituta das estirpes vacinais BCG (Kremer <i>et al.</i> , 1998; van Soolingen <i>et al.</i> , 1998; Brodin <i>et al.</i> , 2004).
<i>M. canettii</i>	Humano	-	Espécie mais divergente do MTC e alegadamente mais próxima da espécie ancestral precursora deste complexo (Brosch <i>et al.</i> , 2002; Fabre <i>et al.</i> , 2004; Gutierrez <i>et al.</i> , 2005).
<i>M. pinnipedii</i>	Focas	Humano Outros mamíferos	Espécie isolada pela primeira vez em focas na América do Sul apresentando lesões de tuberculose (Zumárraga <i>et al.</i> , 1999), tendo sido também associada a casos de tuberculose noutros mamíferos em parques zoológicos (Moser <i>et al.</i> , 2008).

Durante muito tempo, a espécie *Mycobacterium bovis* foi apontada como a precursora das restantes espécies actuais do complexo por ter um vasto conjunto de hospedeiros. *Mycobacterium tuberculosis* teria evoluído a partir de *M. bovis* por fenómenos de adaptação e especialização ao Homem (Diamond, 2002). No entanto, esta hipótese foi abandonada após a análise das sequências dos genomas das espécies do MTC (Cole *et al.*, 1998; Fleischmann *et al.*, 2002; Garnier *et al.*, 2003). Foram identificadas no genoma de *M. bovis* deleções irreversíveis de determinadas regiões cromossómicas, denominadas Regiões de Diferença (RDs, do Inglês, *Regions of Difference*), em número bastante superior comparativamente aos restantes membros do complexo. O resultado da análise destas deleções permitiu a Brosch e colaboradores (2002) traçar uma nova árvore filogenética para este complexo, mais tarde confirmada por outro estudo independente (Mostowy *et al.*, 2005), em que *M. bovis* e *M. bovis* BCG aparecem como os últimos descendentes desta filogenia (Figura 1.1). Por exemplo, todas as estirpes vacinais existentes de *M. bovis* BCG partilham a deleção da região RD1 comparativamente aos restantes membros do complexo, o que leva a suspeitar do importante papel desta região na virulência das espécies patogénicas.

Foram produzidas outras filogenias para o MTC com recurso a outros marcadores moleculares, em particular a identificação de SNPs (do Inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*), que representam polimorfismos genéticos numa só base nucleotídica (Gutacker *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2004; Huard *et al.*, 2006; Karboul *et al.*, 2006; Alland *et al.*, 2007). O conjunto dos membros do MTC que têm nos animais os seus hospedeiros principais apresenta em comum não só a ausência da RD9, que está no entanto presente em *M. tuberculosis*, mas também outras particularidades noutros marcadores, nomeadamente nas sequências espaçadoras delectadas da região DR (do Inglês, *Direct Repeats*) e mutações em determinados genes. Recentemente, Smith e colaboradores (2009) propuseram uma árvore filogenética global para o MTC, congregando a informação de todos estes marcadores moleculares (Figura 1.2), que vem confirmar os trabalhos de Brosch e colaboradores (2002).



**Figura 1.1.** Filogenia do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* baseada na análise das Regiões de Diferença. Cada seta azul representa a deleção de uma ou mais RDs específicas numa determinada espécie (Adaptado de Brosch *et al.*, 2002).



**Figura 1.2.** Evolução dos membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* desprovidos de RD9. As espécies ancestrais estão numeradas de Anc1 a Anc6 (Adaptado de Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009).

## 1.2. A tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma importante doença animal crónica e debilitante. Trata-se de uma zoonose com elevado impacto sócio-económico, decorrente da baixa produtividade dos bovinos e do custo associado aos programas de controlo e erradicação da doença, consistindo também um risco importante para a saúde pública (Kantor e Rittaco, 1994; Acha e Szyfres, 2001). O principal agente etiológico desta doença é a bactéria *Mycobacterium bovis*. Como já referido atrás, além do *M. bovis* afectar os bovinos, também pode causar tuberculose noutras espécies de mamíferos, incluindo o Homem. A tuberculose bovina apresenta uma evolução clínica preponderantemente crónica, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas típicas, principalmente no pulmão e nódulos linfáticos, apesar de qualquer órgão poder ser afectado. As principais vias de infecção da tuberculose bovina nos animais são o contágio directo por inalação, por ingestão e, menos frequente, por via congénita. A forma de transmissão mais comum é directamente por via aerógena, devido também à elevada taxa de sobrevivência do agente etiológico em aerossóis (Gannon *et al.*, 2007). O contágio por via indirecta também pode ocorrer em virtude de *M. bovis* ser resistente a condições ambientais adversas, conseguindo sobreviver durante mais de 74 dias em fómites e entre dois a seis meses em fezes, consoante as condições de humidade e temperatura (Phillips *et al.*, 2003). A localização anatómica das lesões sugere a via de infecção mais provável: lesões hepáticas indicam a infecção congénita, lesões intestinais a infecção por via digestiva e as lesões no aparelho respiratório a via aerógena.

Apesar de *M. tuberculosis* ser a principal causa da tuberculose em humanos, a espécie *M. bovis* é responsável entre 0,5 a 7,2% dos casos de tuberculose humana em países industrializados e estima-se que é responsável por 10 a 15% de novos casos nos países em vias de desenvolvimento (Rua-Domenech, 2006). Os estudos sobre a prevalência de tuberculose humana causada por estas espécies em Portugal são escassos. Foi sugerido que 3,4% dos casos de tuberculose detectados no Hospital Amadora-Sintra entre 1999 e 2002 foram causados por *M. bovis*, mas estudos posteriores não confirmaram a classificação dos isolados (David *et al.*, 2005), evidenciando a fragilidade dos métodos utilizados na sua identificação.

Assim como a tuberculose humana, a tuberculose bovina possui distribuição mundial e assume grande importância em todo o mundo. Esta doença, apesar de ter sido erradicada ou

eficientemente controlada nos países mais desenvolvidos, continua a causar importantes problemas no desenvolvimento pecuário de um grande número de países em vias de desenvolvimento (O' Reilly e Daborn, 1995; Cosivi *et al.*, 1998; Etter *et al.*, 2006). Em Portugal, todos os anos os custos são elevados, decorrentes das indemnizações aos produtores, abate de animais infectados e iniciativas de controlo e erradicação da doença. Não obstante o esforço por parte das autoridades veterinárias, a erradicação da tuberculose bovina ainda não foi alcançada em Portugal, embora a prevalência seja baixa no contexto Europeu. A diminuição dos valores da incidência da tuberculose bovina foi registada desde 1997 (Reviriego Gordejo e Vermeersch, 2006; Plano Nacional de Erradicação da Tuberculose Bovina, DGV, 2009). Em 2007, a prevalência reportada nos efectivos bovinos foi de 0,04% contra 0,07% e 0,09% em 2005 e 2004, respectivamente. Como se pode visualizar na Tabela 1.3, tem existido um ligeiro decréscimo da prevalência da doença em Portugal, verificando-se um decréscimo de 0,06% em 7 anos (DGV, 2009).

**Tabela 1.3.** Prevalência da tuberculose bovina em Portugal (Adaptado de DGV, 2009)

Ano	Nº total de animais testados	Nº animais positivos	% Animais positivos (Prevalência animal)
2000	808.214	830	0,10
2001	783.680	546	0,07
2002	776.231	716	0,09
2003	958.306	1.221	0,13
2004	984.527	856	0,09
2005	976.532	647	0,07
2006	976.893	425	0,04
2007	1.006.908	414	0,04

### **1.3. Diagnóstico da tuberculose bovina**

Uma vez que a tuberculose bovina se manifesta como um problema de saúde pública, é imperativo o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas metodologias para um diagnóstico mais eficiente desta patologia, sejam elas convencionais ou moleculares, tornando-se uma prioridade de investigação internacional. A identificação laboratorial rápida e específica dos agentes etiológicos desta doença revela-se assim de extrema importância, contribuindo para um melhor conhecimento da sua epidemiologia e levando, em última análise, a um controlo mais efectivo da infecção.

#### **1.3.1. Métodos convencionais de diagnóstico**

Tradicionalmente, o combate à tuberculose bovina faz-se pela implementação de uma rotina de testes tuberculínicos para a certificação de explorações livres e o abate de animais infectados. Esta estratégia representa um passo importante para a erradicação e vigilância da doença. Para fazer o diagnóstico definitivo da tuberculose bovina, é necessário o cultivo e a identificação do agente etiológico a partir das amostras biológicas infectadas. No método de visualização microscópica directa de micobactérias em esfregaços é usada preferencialmente a coloração específica de Ziehl-Neelsen. Esta técnica, apesar de rápida e barata, só consegue revelar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em concentrações superiores a  $10^4$  bactérias por ml, sendo que esta técnica não permite também a distinção entre os membros da família Mycobacteriaceae. Deste modo, embora a demonstração microscópica de BAAR nos produtos biológicos corresponda na maioria dos casos a tuberculose, a baixa sensibilidade e especificidade desta técnica tornam imperativo o recurso a métodos culturais de diagnóstico. No entanto, o crescimento dos agentes nos meios de cultura laboratoriais é extremamente fastidioso. O isolamento em cultura de *M. bovis* pode demorar seis semanas, ocorrendo frequentemente problemas de contaminação, sendo a adição de antimicrobianos aos meios de cultura muitas vezes incapaz de contornar este problema. Outras espécies de *Mycobacterium* revelam-se ainda mais fastidiosas do que *M. bovis*, como por exemplo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, cuja cultura pode chegar a seis meses, ou não são cultiváveis de todo, como no caso de *Mycobacterium leprae*. Aliás, a velocidade de crescimento das micobactérias em meios de cultura específicos tem sido adoptada como um dos principais critérios de classificação deste género, separando-o em dois grupos principais: as

micobactérias de crescimento rápido (inferior a 7 dias), que incluem as espécies saprófitas como *M. smegmatis*, e as de crescimento lento (superior a 7 dias), que incluem as espécies patogénicas para o Homem e para os animais, e que requerem factores específicos de crescimento. Deste modo, as técnicas microbiológicas clássicas usadas no isolamento de micobactérias revelam uma baixa sensibilidade, sendo também muito demoradas chegando, como descrito atrás, a ser necessárias várias semanas para o isolamento e a identificação final da espécie. Em microrganismos cujo desenvolvimento em meios de cultura convencionais é extremamente fastidioso, como é o caso das micobactérias patogénicas, o recurso a testes moleculares de diagnóstico, que encurtam o tempo de resposta do laboratório, revela-se aliciante.

### **1.3.2. Métodos moleculares de diagnóstico**

O mercado global do Diagnóstico *In Vitro* (IVD) apresenta um crescimento de 6% ao ano, com domínio do diagnóstico químico e imunodiagnóstico, num valor estimado em €30.000 milhões para 2009 (“*Worldwide Market for In Vitro Diagnostic Tests*”, Kalorama Information, 2008). O mercado do IVD veterinário corresponde a cerca de 3% deste valor. Entre os segmentos mais promissores do IVD, com crescimento de 20% ao ano, encontra-se o diagnóstico molecular, principalmente baseado na análise de ácidos nucleicos (80% deste segmento corresponde ao diagnóstico de doenças infecciosas). Ao diagnóstico molecular estão normalmente associados melhoramentos na sensibilidade, especificidade e tempo de resposta em relação aos métodos convencionalmente utilizados. A tendência do mercado será, aliás, a crescente substituição dos métodos convencionais pelos moleculares, com ênfase para os testes rápidos.

No diagnóstico da tuberculose humana, a identificação específica da espécie de micobactéria que provoca a infecção assume cada vez maior importância, não só para o estudo da epidemiologia desta doença infecciosa mas também para orientação do tratamento. Por exemplo, a espécie *M. bovis* é intrinsecamente resistente à pirazinamida, um antibiótico usado no tratamento da tuberculose (Scorpio e Zhang, 1996). Também na área veterinária é importante a diferenciação entre as espécies do complexo *M. tuberculosis*, nomeadamente no estudo da epidemiologia das doenças que estas espécies provocam. O diagnóstico convencional da tuberculose animal e humana, no entanto, não diferencia normalmente entre

as várias espécies do complexo. Esta discriminação, na maior parte dos casos, é apenas possível com recurso ao diagnóstico molecular. A análise de polimorfismos do gene *gyrB* por PCR-RFLP permite distinguir entre os principais membros do complexo, com excepção de *M. tuberculosis* e *M. africanum* tipo II (Niemann *et al.*, 2000). A análise dos polimorfismos do gene *gyrB* tem sido também utilizada noutros géneros bacterianos para a diferenciação de espécies e inferência de filogenias. Outra abordagem molecular é a análise de algumas Regiões de Diferença no genoma destas espécies (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002). Como já atrás referido, o padrão da presença, ou ausência, de algumas RDs parece reflectir a sua história evolutiva, pelo que a respectiva análise se apresenta como uma alternativa fiável para uma correcta identificação destas espécies (Huard *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2006; Pinsky e Banaei, 2008). Também a diferenciação entre as estirpes virulentas e vacinais (BCG) é possível através da análise das RDs. Verifica-se, nas estirpes BCG, a ausência de RDs onde se localizam genes envolvidos na produção de factores de virulência (por exemplo proteína ESAT6).

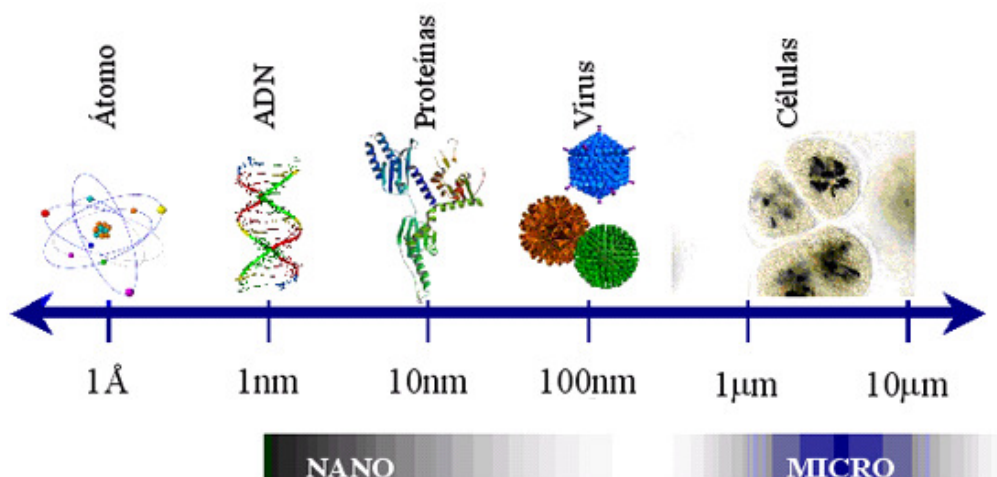
Ao longo dos últimos anos têm sido publicados inúmeros métodos para a detecção e identificação moleculares para micobactérias, alguns dos quais já numa fase de comercialização, baseados quer na hibridação com sondas (p.e. AccuProbe e Gen-Probe), quer na amplificação de sequências por PCR. Tem existido um esforço por parte da comunidade científica, no sentido de continuar a testar e a desenvolver novos métodos de diagnóstico potencialmente mais sensíveis, permitindo a aplicação destes testes directamente em amostras clínicas. Particularmente promissoras para o diagnóstico de Tuberculose afiguram-se as técnicas baseadas em PCR em tempo real. Por exemplo, Pinsky e Banaei (2008) desenvolveram um método baseado em PCR em tempo real para a identificação de membros do MTC, tendo em conta a análise de deleções genómicas. Também Mishra e colaboradores (2005) apresentaram outra abordagem molecular, com base na análise do gene *hupB* pela técnica de *nested*-PCR, para a identificação e detecção directas de *M. tuberculosis* e de *M. bovis* em amostras biológicas de origem animal. Várias regiões genómicas têm sido usadas como alvo para a identificação e detecção de membros do MTC. Por exemplo a análise do gene *mtp40*, que codifica para uma fosfolipase C, foi usada para diferenciar entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, estando este gene ausente na segunda espécie. No entanto, foi já descoberto que este gene está também ausente em algumas estirpes de *M. tuberculosis* (Vincent *et al.*, 2003). O pseudogene *oxyR* e o gene *pncA*, que codifica para a pirazinamidase

(Sreevatsan *et al.*, 1996; Monteros *et al.*, 1998; Barouni *et al.*, 2004), apresentam, cada um, um polimorfismo numa só base entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, não permitindo no entanto a diferenciação de outros membros do complexo, como *M. africanum* (Vincent *et al.*, 2003). Noutra exemplo, o gene *hupB* que codifica para uma histona, permite apenas também a diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Prabhakar *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2005).

Os métodos moleculares revelam-se promissores para um diagnóstico mais rápido e específico da tuberculose animal e humana, contudo é necessário torná-los mais simples, acessíveis e estandardizados para uma utilização mais ampla e efectiva na rotina clínica laboratorial.

#### 1.4. Nanotecnologia e nanodiagnóstico

O crescente interesse em materiais e dispositivos cada vez mais pequenos provocou na ciência uma concentração de esforços de forma a trabalhar em escalas cada vez menores. Esta demanda provocou o surgimento de uma nova designação para a tecnologia, a nanotecnologia (Jain, 2003). Este novo ramo pode assim ser definido como a tecnologia capaz de produzir e aplicar estruturas, aparelhos, dispositivos e sistemas, com controlo de forma e tamanho numa escala nanométrica (Figura 1.3) e a exploração de novas propriedades e fenómenos que se desenvolvem a essa escala.



**Figura 1.3.** Escala nanométrica – exemplos biológicos de alguns organismos e estruturas, desde a escala micrométrica até à escala nanométrica (Adaptado de: <http://ifs.massey.ac.nz/undergrad/degrees/nanoscience>).

O conceito de bionanotecnologia, onde se inclui o nanodiagnóstico, surge do desenvolvimento de novas metodologias e novas plataformas à nanoescala com aplicação biológica, nomeadamente para o desenvolvimento de biossensores, nanodiagnóstico de doenças infecciosas, detecção de ácidos nucleicos, detecção de SNPs, “*drug delivery*”, terapia génica, entre outras aplicações (Jain, 2003).

A utilização de nanopartículas (NPs) no desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico revela-se bastante promissora, particularmente as nanopartículas de metais nobres como o ouro (Baptista *et al.*, 2008; Wilson, 2008). As NPs têm um tamanho entre 1 e 500 nm e podem-se encontrar dispersas em meio sólido, líquido ou gasoso. A maior parte apresenta uma forma esférica, com propriedades físicas e químicas específicas que permitem a sua detecção, análise e quantificação de uma maneira mais eficiente. As NPs metálicas podem ser constituídas por diversos metais nobres, tais como: Au, Pt, Ag. De todas as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são as que maior interesse despertaram e levaram ao estudo intensivo das suas propriedades ópticas, magnéticas e eléctricas. Quando excitadas por um campo electromagnético incidente, estas nanopartículas produzem o denominado efeito de ressonância do plasmão de superfície (SPR, do Inglês, *Surface Plasmon Resonance*), que consiste na oscilação colectiva de electrões livres na superfície da partícula, produzindo propriedades de absorção e dispersão eléctrica intensas. A SPR vai depender do tamanho da partícula, do material de que é composta e da sua forma. A ressonância do plasmão de superfície das nanopartículas de ouro é responsável pelas suas cores intensas. Em solução, as nanopartículas de ouro monodispersas demonstram uma cor vermelha, com o pico da banda de SPR na região dos 520 nm. Contrariamente, uma solução contendo nanopartículas de ouro agregadas demonstra a cor azul, correspondendo a um deslocamento para o vermelho (*red-shift*) do pico da banda de SPR para aproximadamente 600 nm.

As AuNPs podem ser sintetizadas através de diferentes métodos (Grzelczak *et al.*, 2008), sendo o mais simples e comum o da redução de um sal de ouro com citrato, obtendo-se uma solução coloidal de NPs quasi-esféricas relativamente monodispersas com um diâmetro entre os 10 e 20 nm (Kimling *et al.*, 2006). Estas nanopartículas podem ser funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados (Storhoff *et al.*, 1998), obtendo-se as chamadas nanossondas de ouro (Au-nanossondas). Em 1996, Mirkin e colaboradores descreveram pela primeira vez um método de detecção colorimétrico de DNA baseado em nanossondas de ouro (Mirkin *et al.*, 1996). O método consiste na utilização de oligonucleótidos de DNA de cadeia simples que

podem ser detectados através de duas nanossondas diferentes, cada uma funcionalizada com um oligonucleótido complementar a uma das regiões do alvo. A hibridação do alvo com as duas nanossondas resulta na formação de uma rede polimérica (método de “*cross-linking*”) que promove a aproximação das nanopartículas de ouro o suficiente para resultar numa alteração de cor da solução de vermelho para azul.

Uma outra estratégia, recorre a uma única sonda que hibrida com os fragmentos de DNA alvo, e em que um aumento da força iónica da solução provoca a agregação das nanopartículas, provocando um *red-shift* do pico da SPR (solução de cor azul). A presença em solução de ácidos nucleicos com uma sequência complementar à da nanossonda estabiliza o sistema e a solução mantém a cor vermelha inicial. A ausência de uma sequência complementar não impede a agregação das nanopartículas e a solução muda a cor para azul, observável visualmente, podendo ser confirmada por espectrofotometria no visível. Este método de detecção colorimétrico, cuja agregação das nanossondas de ouro é induzida pelo aumento da concentração de sal na solução, é denominado de método “*non-cross-linking*” e tem sido utilizado para a detecção de sequências específicas de DNA e RNA, incluindo a caracterização de mutações e polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (Sato *et al.*, 2006; Doria *et al.*, 2007), o estudo de expressão génica (Huber *et al.*, 2004; Baptista *et al.*, 2005) e a detecção e identificação de agentes patogénicos, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis* (Baptista *et al.*, 2006).

### 1.5. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação

O presente trabalho teve como objectivo global desenvolver métodos de identificação molecular que possibilitem discriminar entre as principais espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* a partir das suas culturas purificadas. Os métodos desenvolvidos deveriam ser passíveis de aplicação futura na rotina clínica laboratorial e servir de base ao desenvolvimento posterior de métodos de diagnóstico molecular da tuberculose bovina directamente a partir de amostras biológicas animais. Neste contexto, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

- ✓ Realizar uma análise comparativa *in silico* das sequências nucleotídicas de membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, com ênfase para as regiões de diferença (RDs) e do gene *gyrB*, de modo a desenhar *primers* e/ou sondas oligonucleotídicas discriminantes entre as várias espécies do complexo
- ✓ Implementar um sistema baseado em PCR para a identificação dos principais membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, baseado na análise do padrão de presença/ausência de RDs relevantes
- ✓ Implementar um sistema baseado na hibridação com nanossondas de ouro para a identificação dos principais membros do complexo, baseado na análise de polimorfismos do gene *gyrB* no genoma destas espécies

Esta dissertação divide-se em quatro secções. Na primeira secção é apresentada uma introdução teórica enquadrando o tema em estudo. Na segunda secção são apresentados os materiais e métodos utilizados no decurso do trabalho. Na terceira secção são apresentados os resultados obtidos e uma discussão crítica sobre os mesmos. Na quarta, e última secção, são tecidas algumas considerações finais sobre o trabalho, os principais resultados obtidos e sugestões de trabalho futuro.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Entidades**

Este trabalho foi realizado na Unidade de Sanidade Animal do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV/INRB, I. P.) e no Centro de Investigação em Genética Molecular Humana do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (CIGMH-DCV/FCT/UNL).

### **2.2. Estirpes analisadas e extracção de DNA**

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho, incluindo as micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras usadas como controlo, estão indicadas na Tabela 2.1. A identificação de cada estirpe foi certificada pelo LNIV, o laboratório de referência Português para a tuberculose bovina, onde as culturas são também mantidas em colecção. A técnica de *gyrB*-PCR-RFLP é usada rotineiramente neste laboratório para a identificação das espécies do MTC (Duarte *et al.*, 2008). O crescimento das estirpes e a extracção de DNA a partir das culturas foram realizados de acordo com procedimentos standardizados (Amaro *et al.*, 2008). Resumidamente, as culturas foram crescidas em meio líquido (Bactec), seguindo-se a extracção do DNA genómico utilizando um método de disrupção mecânica com microesferas combinado com uma lise enzimática das paredes micobacterianas. O DNA extraído foi purificado com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol, após o que foi dissolvido em água bidestilada estéril e quantificado por espectrofotometria.

**Tabela 2.1.** Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho

<b>Espécie</b>	<b>Estirpe*</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC 25177 LNIV 9605
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5 LNIV: 13027; 5530/0/05; 11265; 7230/4; 14421/2; 24497/6; 8855; 5889; 10044; 14577; 13280/6; 13280/4; 34875; 20564  **LNIV: 17010; 21136; 19489; 20331; 20332; 20408; 28840/2; 28646; 28430; 26807; 28472; 28473; 28843; 29577/1; 29968
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	ATCC 27291
<i>Mycobacterium caprae</i>	LNIV: 17320; 4958/0/05; 8403; 15244; 20752
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC 25291 <sup>T</sup>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	LNIV 39888
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	LNIV 23063/4
<i>Corynebacterium striatum</i>	LNIV 12352

\*ATCC, *American Type Culture Collection*; LNIV, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal.

\*\*Estirpes sujeitas aos testes de identificação molecular desenvolvidos no presente trabalho, mas em que a respectiva identificação oficial do LNIV foi comunicada ao operador apenas após a realização dos mesmos (*blind-tests*).

### 2.3. Desenho de *primers* e sondas de DNA

#### Gene *gyrB*

A análise comparativa de sequências do gene *gyrB* de micobactérias foi efectuada através do alinhamento das sequências, usando o programa CLUSTAL X v2.0 (Larkin *et al.*, 2007). As sequências nucleotídicas representativas das espécies do Complexo *Mycobacterium*

*tuberculosis*, e de outras espécies controlo, foram recolhidas a partir da base de dados do *National Center for Biotechnology Information*, USA (GenBank) com os seguintes números de acesso: AB014184 para *M. bovis*; Z80233 para *M. tuberculosis*; AJ749915 para *M. canettii*; AJ276122 para *M. caprae*; AB014192 para *M. africanum*; AB014205 para *M. microti*; AB014202 para *M. gastri*; AB014189 para *M. avium* subsp. *avium*; e EU029114 para *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Foram seleccionados segmentos oligonucleotídicos no gene *gyrB* que possibilitassem identificar os membros do MTC e discriminar entre as principais espécies deste complexo, nomeadamente *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Tabela 2.2). Os oligonucleótidos tiolados específicos foram adquiridos à empresa STAB Vida (Portugal) e usados para produzir nanossondas de ouro. A especificidade das sondas de DNA desenhadas foi testada *in silico* usando as ferramentas BLAST do GenBank.

#### Regiões de Diferença (RDs)

As sequências das RDs das micobactérias analisadas neste trabalho foram recolhidas a partir do GenBank e analisadas como descrito atrás para o gene *gyrB*. Foram assim desenhados *primers* que permitem amplificar segmentos específicos internos às Regiões de Diferença RD1, RD4 e RD9 (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2.** Sequências dos *primers* e sondas de DNA utilizados neste trabalho

Designação	Sequência (5'-3')	Alvo	Obs.
<b>Primers para amplificação gene <i>gyrB</i></b>			
MTUB-f	TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC	<i>gyrB</i> (MTC)	Kasai <i>et al.</i> (2000)
MTUB-r	ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG		
<b>Primers para amplificação das Regiões de Diferença (RDs)</b>			
F3-RD1	TTA TCT TGG CGT TGA CGA TG	Gene <i>Rv3878</i> (RD1)	240 pb
B3-RD1	CAT ATA AGG GTG CCC GCT AC		
F3-RD4	CCT GCA AGA AAC GAC CCG	Gene <i>Rv1510</i> (RD4)	269 pb
B3-RD4	ACC CGT ACT GTG TCC ACC		
F3-RD9	GTG TAG GTC AGC CCC ATC C	Gene <i>Rv2073c</i> (RD9)	233 pb
B3-RD9	GCT ACC CTC GAC CAA GTG TT		
F3-ESAT6	TTT CGC GGG TAT CGA GGC	Gene <i>esat6</i> (RD1)	235 pb
B3-ESAT6	CGA AGC CAT TGC CTG ACC		
<b>Oligonucleótidos para síntese das nanossondas de ouro</b>			
gComplex	CCG AGG ACA CAG CCT TGT TC	<i>gyrB</i> (MTC)	5'-tiol
gMTub	TTT GAA GCC AAC CCC ACC GAC G	<i>gyrB</i> ( <i>M. tuberculosis</i> )	5'-tiol
gMBov	CGT TTG TGC AGA AGG TCT GTA AT	<i>gyrB</i> ( <i>M. bovis</i> )	5'-tiol

#### **2.4. Amplificação do gene *gyrB* por PCR**

Um fragmento de 1020 pb do gene *gyrB* foi amplificado usando os *primers* MTUB-f e MTUB-r (Tabela 2.2), específicos para os membros do MTC, utilizando um procedimento adaptado de Kasai *et al.* (2000) e Niemann *et al.* (2000). Resumidamente, as reacções de PCR foram efectuadas num volume final de 25 µl, usando 200 µM de dNTPs (Amersham Biotech), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 20 pmol de cada um dos *primers* e 1 µl da solução de DNA (ver 2.2), sendo substituído por água bidestilada esterilizada no controlo negativo. A amplificação foi efectuada num termociclador MJmini™ (BioRad) usando 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1,5 min a 55 °C, e 1,5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram precipitados com etanol, ressuspensos em água desionizada e quantificados por espectrofotometria num aparelho NanoDrop ND-1000. Os produtos amplificados foram mantidos a -70 °C até à sua utilização.

#### **2.5. Amplificação das Regiões de Diferença por PCR**

As reacções de PCR para amplificação de regiões dos genes *Rv3878* e *esat6* (RD1), *Rv1510* (RD4) e *Rv2073c* (RD9) foram optimizadas neste trabalho. Resumidamente, as reacções foram efectuadas num volume final de 25 µl, usando 200 µM de dNTPs (Amersham Biotech), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 20 pmol de cada um dos dois *primers* (para cada região a amplificar, Tabela 2.2) e 1 µl da solução de DNA extraído (ver 2.2), sendo substituído por água bidestilada esterilizada no controlo negativo. A amplificação foi efectuada num termociclador MJmini™ (BioRad) usando 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1,5 min a 65°C, e 1,5 min a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados electroforéticamente num gel de agarose a 1,5% e mantidos a -70°C até à sua utilização.

#### **2.6. Visualização dos produtos de amplificação**

Para a detecção dos produtos de amplificação, foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 1x (108 g de Tris-HCl, 55 g de ácido bórico, 40 ml de uma solução 0,5 M de EDTA, pH8, para um volume final de 1000 ml em água bidestilada) ao qual foi adicionado 0,02 mg/ml de brometo de etídeo. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o HyperLadder™ III (para o gene *gyrB*) e o HyperLadder™ II (para as RDs) (Bioline).

Para a electroforese, foram adicionados 2  $\mu\text{l}$  de solução de deposição (30% p/v de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol, 2 mM de EDTA) a 5  $\mu\text{l}$  do produto de cada amostra, resultante da amplificação por PCR. A electroforese decorreu a 90 V durante 60 min. As bandas foram visualizadas num transiluminador de luz ultravioleta e as imagens captadas com um sistema de imagem digital.

## 2.7. Síntese das nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro com um diâmetro médio de 15 nm foram sintetizadas através do método de redução do citrato descrito por Lee e Meisel (1982). Resumidamente, 250 ml de 1 mM  $\text{HAuCl}_4$  (ouro na forma de ácido cloroáurico, Sigma) foram aquecidos até à ebulição, foram adicionados 25 ml de citrato de sódio a 38,8 mM, seguiu-se um aquecimento contínuo seguido de 15 min de refluxo contínuo. Depois disto, a solução permaneceu à temperatura ambiente para arrefecer. Calculou-se a concentração das nanopartículas de ouro de acordo com a lei de Lambert Beer, sendo o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{526\text{nm}}$ ) cerca de  $2,33 \times 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . O produto da síntese foi mantido à temperatura ambiente e protegido da luz.

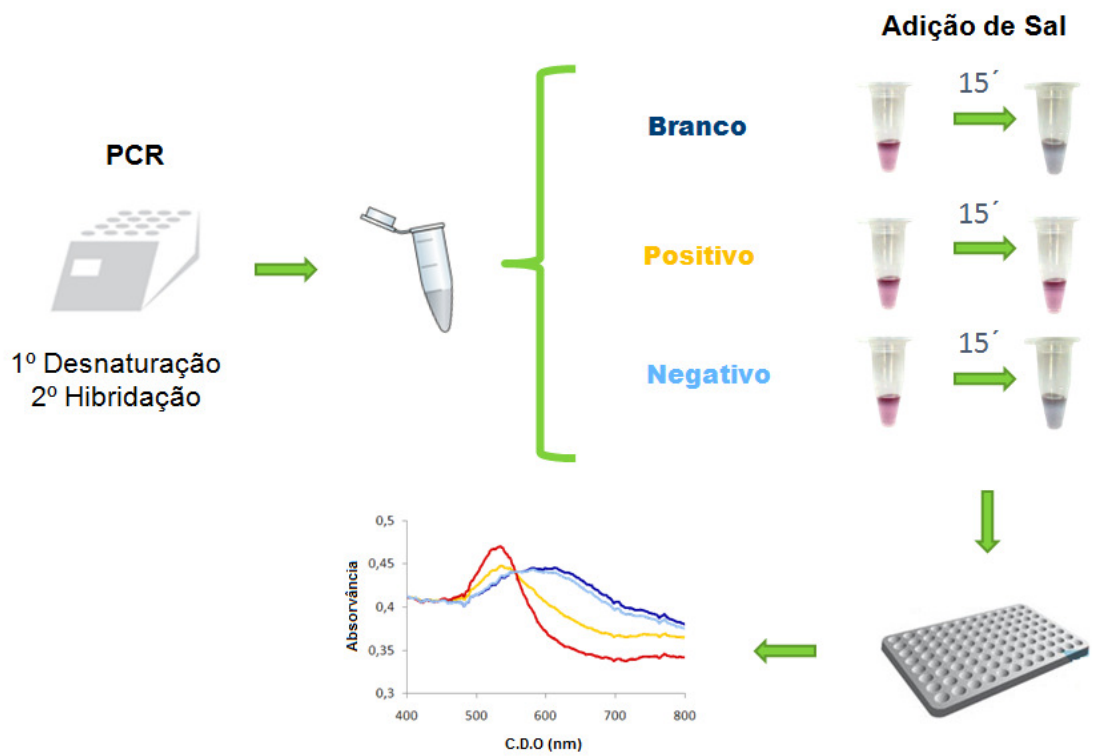
## 2.8. Síntese de nanossondas de ouro

As nanossondas de ouro foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos por Storhoff *et al.* (1998). Resumidamente, os oligonucleótidos tiolados (Tabela 2.2), em 0,1 M de ditioneitol – DTT (Fluka), foram purificados em três passos de extracção em dois volumes de acetato de etilo durante 5 min, e passagem em colunas de *Sephadex G-25 – NAP-5* (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante. Os oligonucleótidos purificados foram em seguida misturados com a suspensão coloidal de AuNPs numa proporção molar (n/n) de 200:1, seguindo-se a adição de tampão fosfato salino II (PBS II – 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH8, 2% SDS) à mistura anterior numa proporção volúmica (v/v) de 1:200. Foram em seguida efectuadas adições sucessivas de tampão PBS III (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH8, 1,5 M NaCl, 0,01% SDS) de 20 em 20 min de modo a perfazer as concentrações finais de NaCl de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 M, seguidas de 10 s de ultra-sons e armazenamento a 25° C durante a noite (16 h). O precipitado resultante, com um aspecto oleoso, foi lavado quatro vezes num volume de PBS IV (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,

pH8, 0,1 M NaCl), por centrifugação durante 20 min à força centrífuga máxima. A concentração final de nanossonda foi ajustada a 15 nM em PBS IV, de acordo com o  $\epsilon_{526\text{nm}}$  das nanopartículas de ouro -  $2,33 \times 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Liu *et al.*, 2007), e as suspensões armazenadas no escuro a 4°C até sua utilização.

## **2.9. Detecção colorimétrica de fragmentos de DNA com nanossondas de ouro**

Cada ensaio foi efectuado num volume total de 30  $\mu\text{l}$ , com as nanossondas de ouro a uma concentração final de 2,5 nM em tampão fosfato (pH 8), 10 mM, 0,5 M NaCl. Para cada sonda, depois da optimização, o método consistiu na comparação visual/espectrofotométrica do “Branco” (sem DNA), tampão fosfato (pH 8), 10 mM, 0,5 M NaCl; amostras positivas contendo um fragmento de DNA com um alvo 100% complementar à nanossonda (concentração final dos fragmentos de DNA alvo de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para a nanossonda gMTub, para *M. tuberculosis*, e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para as nanossondas gComplex e gMBov, específicas para os membros do MTC e para *M. bovis*, respectivamente); e amostras negativas, contendo um fragmento de DNA não-complementar à nanossonda (p.e. de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *hominissuis* e *Corynebacterium striatum*). Depois de 10 min de desnaturação a 95 °C, as misturas DNA alvo/nanossonda permaneceram durante 30 min a 20 °C (com a redução da temperatura dos 95 °C para 20 °C controlado a 1 °C.seg<sup>-1</sup>) e adicionou-se MgCl<sub>2</sub> a uma concentração final de 0,07 M para as nanossondas gMTub e gMBov e 0,04 M para gComplex. Passados 15 min à temperatura ambiente para a manifestação da cor, as soluções, incluindo o branco, foram analisadas por espectroscopia do visível num leitor de microplacas (Tecan Infinite M200) (Figura 2.1). Os espectros de absorvância resultantes dos ensaios colorimétricos foram adquiridos pelo programa *i-control*<sup>TM</sup> do leitor de microplacas. Os resultados dos ensaios colorimétricos efectuados, em replicado, são apresentados na forma de média aritmética, sendo calculados também os respectivos valores de desvio padrão.



**Figura 2.1.** Representação esquemática do método de detecção com nanossondas de ouro. O método consiste na comparação visual das soluções antes e depois da adição de sal induzindo a agregação das nanossondas: nanossonda sozinha – “Branco”, nanossonda na presença da sequência de DNA complementar – “Positivo”; e nanossonda de ouro na presença da sequência de DNA não-complementar – “Negativo”.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Amplificação do gene *gyrB* por PCR

Durante as últimas duas décadas, têm sido desenvolvidas novas ferramentas moleculares, usando determinados *loci*, que permitem a detecção e a identificação rápidas dos principais membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Drobniewski *et al.*, 2003; Huard *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2008). Uma dessas ferramentas de identificação molecular baseia-se na amplificação por PCR do gene *gyrB*, que codifica para a subunidade B da girase do DNA (uma topoisomerase do tipo II essencial para a replicação bacteriana), seguida da análise de locais polimórficos através da técnica de RFLP (do Inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Kasai *et al.*, 2000; Niemann *et al.*, 2000). Para a amplificação do gene *gyrB* utilizam-se normalmente os *primers* desenvolvidos originalmente por Kasai e colaboradores (2000), específicos para as espécies do MTC e que originam fragmentos de DNA com 1020 pb.

Neste trabalho procedeu-se à amplificação do gene *gyrB* a partir de extracções de DNA genómico de todas as estirpes enumeradas na Tabela 2.1, usando os *primers* atrás referidos desenvolvidos por Kasai e colaboradores (2000). Com este passo prévio pretendia-se confirmar a identidade das estirpes a utilizar no decurso deste trabalho, com especial relevância para aquelas pertencentes ao MTC. Após as reacções de PCR, confirmou-se que o fragmento de 1020 pb, correspondente ao gene *gyrB*, apenas foi amplificado a partir das estirpes pertencentes a espécies do MTC, nomeadamente de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*. Em contraste, verificou-se a ausência de amplificação deste fragmento para as espécies exteriores ao complexo, nomeadamente a partir das micobactérias *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, e para *Corynebacterium striatum*. Estas espécies podem assim ser também utilizadas como controlos negativos desta reacção de PCR. A Figura 3.1 ilustra os géis de electroforese correspondentes à amplificação do gene *gyrB* por PCR de algumas das estirpes testadas. Com base na presença ou ausência deste gene, confirmou-se que das 42 estirpes bacterianas testadas, 38 estirpes foram identificadas como pertencentes ao MTC e 4 estirpes como exteriores ao complexo (Tabela 3.1). É de realçar que 15 estirpes pertencentes ao MTC foram sempre utilizadas num formato

de “teste cego” (*blind-test*) ao longo deste trabalho, cuja identificação foi oficializada no LNIV (Tabela 3.1).



**Figura 3.1.** Ilustração dos géis de electroforese obtidos correspondentes à amplificação do gene *gyrB* por PCR. Em cima: *M. tuberculosis* LNIV 9605 (1) e ATCC 25177 (2); *M. bovis* LNIV 5530/0/05 (3) e LNIV 13027 (4); *M. caprae* LNIV 17320 (5) e LNIV 4958/0/05 (6); *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 (7); *M. bovis* BCG ATCC 27291 (8); e controlo negativo (9). Em baixo: *M. bovis* LNIV 17010 (10), LNIV 21136 (11), LNIV 19489 (12), LNIV 20331 (13), LNIV 20332 (14), LNIV 20408 (15), LNIV 11265 (16), LNIV 7230/4 (17) e LNIV 14421/2 (18); *M. caprae* LNIV 15244 (19); *M. avium* subsp. *paratuberculosis* LNIV 39888 (20); *M. avium* subsp. *hominissuis* LNIV 23063/4 (21); *Corynebacterium striatum* LNIV 12352 (22); e controlo negativo (23). Marcador de pesos moleculares HyperLadder™ III (M).

**Tabela 3.1.** Resultados da amplificação do gene *gyrB* por PCR

<b>Espécie</b>	<b>Estirpe*</b>	<b><i>gyrB</i>-PCR</b>
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 LNIV 9605	✓
<i>M. bovis</i>	AN5 LNIV: 13027; 5530/0/05; 11265; 7230/4; 14421/2; 24497/6; 8855; 5889; 10044; 14577; 13280/6; 13280/4; 34875; 20564 **LNIV: 17010; 21136; 19489; 20331; 20332; 20408; 28840/2; 28646; 28430; 26807; 28472; 28473; 28843; 29577/1; 29968	✓
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 27291	✓
<i>M. caprae</i>	LNIV: 17320; 4958/0/05; 8403; 15244; 20752	✓
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC 25291	x
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	LNIV 39888	x
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	LNIV 23063/4	x
<i>Corynebacterium striatum</i>	LNIV 12352	x

\*ATCC, *American Type Culture Collection*; LNIV, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal.

\*\*Estirpes sujeitas aos testes de identificação molecular desenvolvidos no presente trabalho, mas em que a respectiva identificação oficial do LNIV foi comunicada ao operador apenas após a realização dos mesmos (*blind-tests*).

✓ , POSITIVO (ocorrência de amplificação).

x , NEGATIVO (ausência de amplificação).

Os resultados obtidos para o conjunto das estirpes analisadas evidenciam que a amplificação do gene *gyrB* por PCR, nas condições utilizadas neste trabalho, permite diferenciar as espécies do MTC das espécies exteriores a este complexo micobacteriano. Esta reacção de amplificação demonstrou ser extremamente robusta e específica.

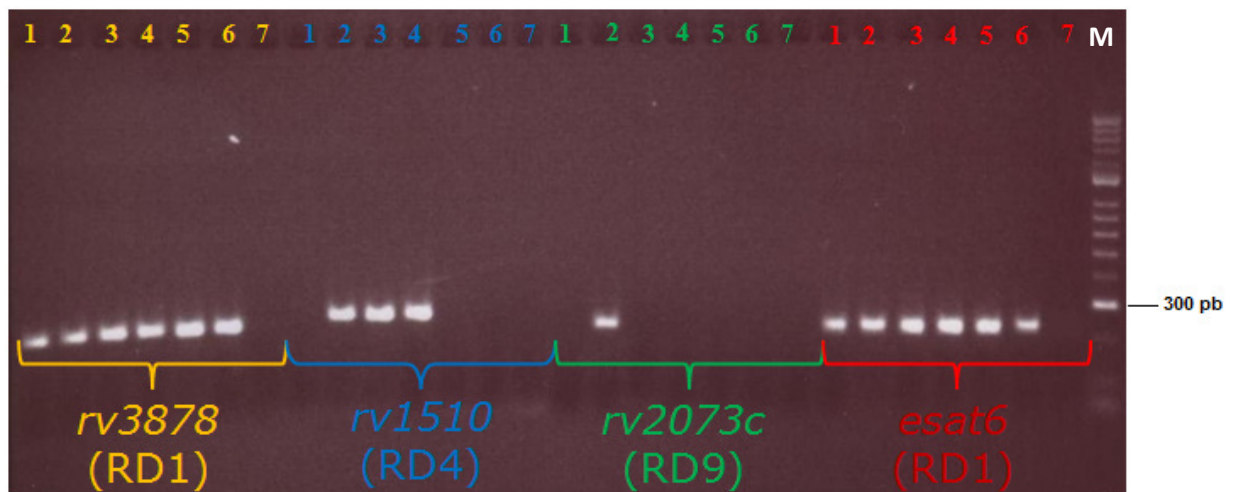


A região RD1, originalmente caracterizada por Ken Stover e seus colaboradores (Mahairas *et al.*, 1996), está presente em todos os membros do MTC com exceção do *M. bovis* BCG (Behr *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2006). Esta região contém oito genes, incluindo o gene *esat6* (Tekaiia *et al.*, 1999), um factor de virulência que codifica para a proteína ESAT6, potente estimuladora do sistema imunitário e um antigénio importante durante as fases iniciais de infecção. Pensa-se que a ausência da RD1 em *M. bovis* BCG é um dos principais factores que levou à atenuação da virulência destas estirpes, permitindo a sua utilização como vacina (Horwitz *et al.*, 1995; Elhay *et al.*, 1998; Rosenkrands *et al.*, 1998). A região RD4 encontra-se presente em todas as espécies do MTC, com exceção das espécies *M. bovis* e *M. bovis* BCG (Brosch *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2006). Esta região contém genes que demonstram alguma semelhança com outros que codificam para proteínas de membrana e enzimas envolvidas na biosíntese de polissacáridos. A região RD9 contém genes que codificam para um tipo de metilase, a oxidoreductase (Gordon *et al.*, 1999). Esta região encontra-se presente em *M. tuberculosis* e *M. canettii*, e ausente em todas as restantes espécies do MTC (Warren *et al.*, 2006). A análise da presença ou ausência das três RDs anteriores permite assim diferenciar entre as principais espécies do MTC responsáveis por tuberculose, com ênfase para a tuberculose em animais de produção: *M. tuberculosis*, *M. caprae* e *M. bovis*, e as estirpes vacinais de *M. bovis* BCG (Tabela 3.2). As restantes espécies do MTC, *M. africanum*, *M. microti* e *M. pinnipedii*, e *M. canettii*, apresentam o mesmo padrão que *M. caprae* e *M. tuberculosis*, respectivamente, mas estas espécies não são normalmente isoladas a partir de animais (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2.** Padrões de presença/ausência das RD1, RD4 e RD9 entre os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Espécie do MTC	(RD1)	(RD4)	(RD9)
<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. canettii</i>	+	+	+
<i>M. caprae</i> ; <i>M. africanum</i> ; <i>M. microti</i> ; <i>M. pinnipedii</i>	+	+	-
<i>M. bovis</i>	+	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	-	-	-

Realizou-se a detecção por PCR das RDs atrás seleccionadas numa selecção das estirpes que se revelaram positivas na amplificação do gene *gyrB*. Para tal foram utilizados os *primers* desenvolvidos neste trabalho. É de realçar, como já atrás foi referido, que para a detecção da presença da região RD1 foram desenhados dois pares de *primers*, um com alvo complementar no gene *rv3878* e outro no gene *esat6*. Para cada estirpe foram portanto efectuadas quatro reacções de PCR em paralelo. Com base nos padrões obtidos de presença e ausência das RDs, e depois de uma optimização do método, foi possível a diferenciação entre as principais espécies do MTC (Figura 3.3; Tabela 3.3).



**Figura 3.3.** Ilustração do resultado de uma electroforese em gel de agarose para determinação da presença ou ausência das RD1, RD4 e RD9 num conjunto de estirpes micobacterianas seleccionadas: *M. bovis* LNIV 13027 (1); *M. tuberculosis* ATCC 25177 (2); *M. caprae* LNIV 17320 (3) e LNIV 20752 (4); *M. bovis* LNIV 11265 (5); LNIV 10044 (6); e Controlo Negativo (7). Marcador de pesos moleculares HyperLadder™ II (M). Para a detecção de RD1 foram realizadas duas reacções de PCR usando dois pares de *primers*, um com alvo complementar no gene *rv3878* e outro no gene *esat6*.

**Tabela 3.3.** Resultados da amplificação das Regiões de Diferença por PCR

Espécie	Estirpe*	RD1		RD4	RD9
		( <i>rv3878</i> )	( <i>esat6</i> )	( <i>rv1510</i> )	( <i>rv2073c</i> )
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 LNIV 9605	+	+	+	+
<i>M. bovis</i>	AN5 LNIV: 13027; 5530/0/05; 11265; 7230/4; 14421/2; 24497/6; 8855; 5889; 10044; 14577; 13280/6; 13280/4; 34875; 20564	+	+	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 27291	-	-	-	-
<i>M. caprae</i>	LNIV: 17320; 4958/0/05; 8403; 15244; 20752	+	+	+	-

\*ATCC, *American Type Culture Collection*; LNIV, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal; +, ocorrência de amplificação; -, ausência de amplificação.

Das 23 estirpes testadas, 15 foram identificadas como *M. bovis*, cinco como *M. caprae* e duas como *M. tuberculosis*. Uma estirpe foi identificada como uma estirpe vacinal de *M. bovis* BCG. Estes resultados foram 100% concordantes com a identificação oficial das estirpes, efectuada no LNIV, por PCR-RFLP do gene *gyrB*, e na ATCC, com a excepção de *M. caprae* LNIV 20752 (ver 3.4). A identificação dos membros do MTC com base na análise das regiões de diferença revela-se assim bastante específica, tendo-se também demonstrado a eficiência dos *primers* desenhados. Adicionalmente, a técnica descrita neste trabalho apresenta ainda a vantagem de ser bastante rápida, permitindo uma diferenciação das estirpes do MTC em apenas cerca de três a quatro horas.

### 3.3. Diferenciação dos membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* com nanossondas de ouro coloidal

#### Análise de sequências

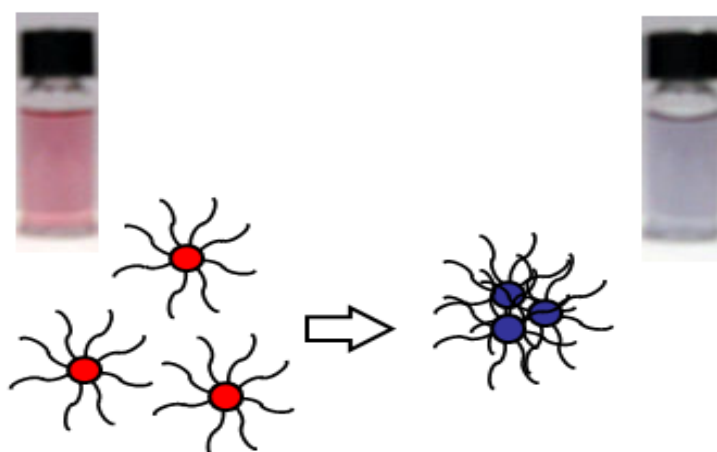
Um dos objectivos específicos deste trabalho consistiu na implementação de um novo método de diagnóstico molecular, baseado na hibridação com nanossondas de ouro coloidal, para a identificação dos principais membros do MTC. O alvo genómico seleccionado para a implementação deste método foi o gene *gyrB*, cuja análise dos respectivos polimorfismos por PCR-RFLP é já usada na identificação dessas espécies. A primeira tarefa consistiu numa análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene *gyrB* de diversas espécies de micobactérias do MTC, e de outras espécies controlo, o que permitiu identificar três segmentos específicos (sequências oligonucleotídicas): (i) uma região que inclui uma sequência específica partilhada por todos os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo as espécies *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. canettii*; (ii) uma região específica para *M. bovis*; e (iii) uma região específica para *M. tuberculosis* que está também presente na espécie *M. canettii* (Figura 3.4). Esta última espécie é, no entanto, raramente isolada e não é considerada clinicamente relevante. Estas sequências foram utilizadas como base para o desenho de oligonucleótidos tiolados específicos, usados depois para a funcionalização das nanopartículas de ouro.



**Figura 3.4.** Análise comparativa de um segmento do gene *gyrB* de micobactérias pertencentes ao MTC e outras exteriores a este complexo. As sequências-alvo complementares às nanossondas de ouro encontram-se sombreadas a amarelo (sonda específica para *M. bovis* – gMBov), laranja (sonda específica para *M. tuberculosis* - gMTub) e amarelo claro (sonda específica para todos os membros do MTC – gComplex). A vermelho estão indicadas todas as mutações nucleotídicas em relação à sequência consenso. Os números de acesso do GenBank estão indicados para cada sequência.

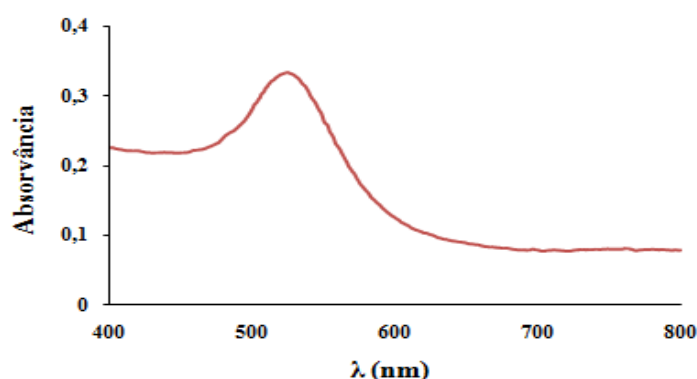
### Caracterização das nanopartículas de ouro

O uso de nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com ssDNA tiolados na extremidade 5' para a detecção colorimétrica de alvos de DNA representa uma alternativa económica e fácil de utilizar comparativamente às técnicas moleculares habituais (Eaton *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008). Isto é possível devido a uma característica muito particular destas nanopartículas, a sua ressonância do plasmão de superfície (SPR), que é responsável pelas suas cores intensas. Em solução, as nanopartículas de ouro monodispersas, com um diâmetro aproximado de 15 nm, demonstram uma cor vermelha e exibem uma banda de SPR de aproximadamente 526 nm no espectro UV do visível. Em contraste, numa solução contendo nanopartículas de ouro agregadas, p.e. pela adição de sal e consequente aumento da força iónica do meio, estas demonstram uma cor azul, correspondendo a uma banda de SPR de aproximadamente 600 nm (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Ilustração da agregação das nanopartículas de ouro coloidal e mudança de cor das respectivas suspensões de vermelho para azul. A agregação das nanopartículas é induzida pelo aumento da concentração de sal, passando a cor da solução de vermelho para azul.

As AuNPs sintetizadas neste trabalho pelo método de redução do citrato (Lee e Meisel, 1982) foram caracterizadas por espectrofotometria UV/Vis (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Espectro de absorvância das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de redução do citrato. Pico de absorvância máximo registado para um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 526 nm.

É possível constatar um pico de absorvância máximo aos 526 nm, característico das AuNPs com um diâmetro aproximado de 15 nm (Baptista *et al.*, 2005; Baptista *et al.*, 2006; Thaxton *et al.*, 2006).

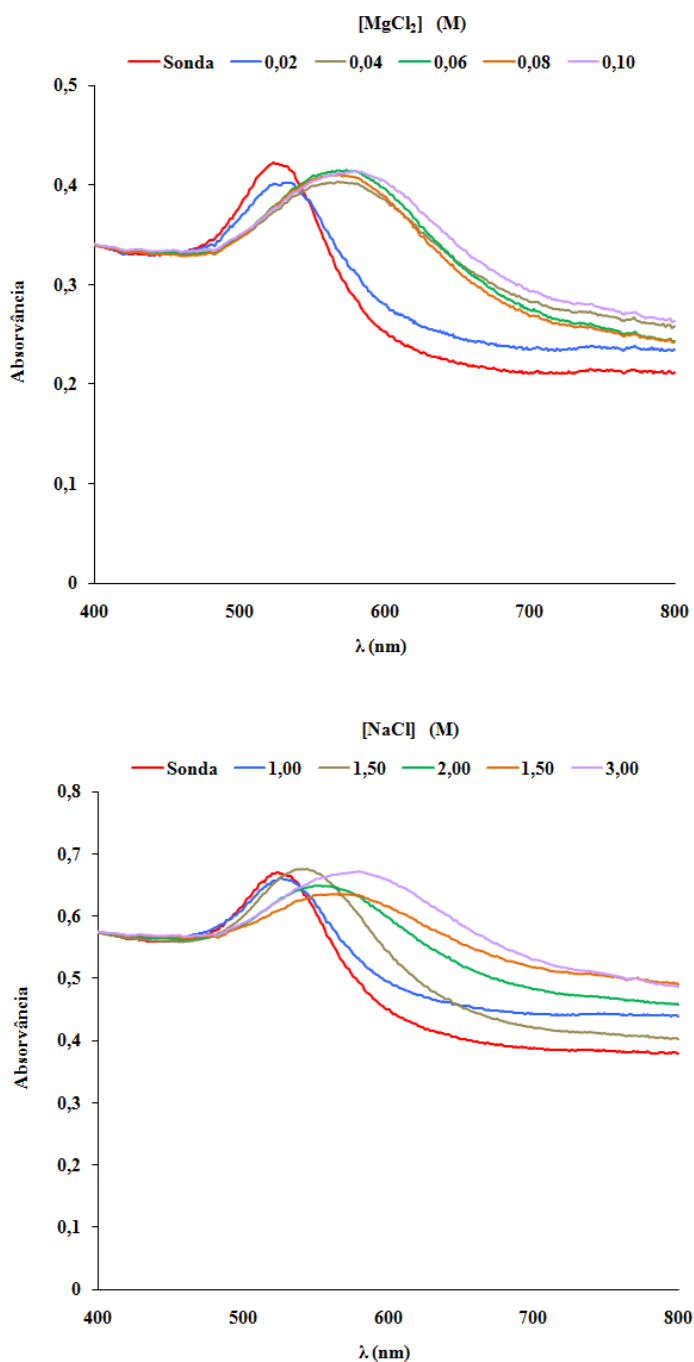
### **Caracterização das nanossondas de ouro**

As nanossondas de ouro, ou Au-nanossondas, resultam da funcionalização das AuNPs com oligonucleótidos tiolados na sua extremidade 5'. Este processo é despoletado após a substituição do citrato pelos oligonucleótidos, que se vão ligar às AuNPs por intermédio de uma ligação tiol de grande estabilidade. O citrato é responsável pela estabilização das AuNPs, tendo um efeito de “*capping*”. A ligação de oligonucleótidos permite também estabilizar as Au-nanossondas aquando do aumento da força iónica do meio provocado pela adição de sal. A concentração de trabalho das três Au-nanossondas assim sintetizadas foi ajustada a 15 nM, sendo depois utilizadas para a hibridação com sequências específicas de DNA.

#### *Ensaio de estabilidade em função da força iónica*

Depois de efectuada a síntese das Au-nanossondas, procedeu-se à sua caracterização em função da força iónica do meio. Com esta caracterização pretendeu-se observar o desvio da banda de SPR e, conseqüentemente, o pico máximo de absorvância, sendo possível determinar a concentração mínima de sal capaz de provocar a agregação da Au-nanossonda.

Foram assim testados dois tipos de sal: cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). Para os ensaios de estabilidade das Au-nanossondas em função da força iônica foi testada uma janela de concentrações específica para cada um dos sais: (i) 0,02 a 0,10 M para o  $MgCl_2$ ; e (ii) 1 a 3 M para o NaCl (Figura 3.7). A quantidade mínima de sal necessária para provocar a agregação completa de cada uma das três nanossondas foi determinada.



**Figura 3.7.** Ensaios de estabilidade em função da força iônica para a nanossonda gComplex. Em cima, os espectros de absorvância correspondentes à adição de  $MgCl_2$ ; em baixo, os espectros correspondentes à adição de NaCl.

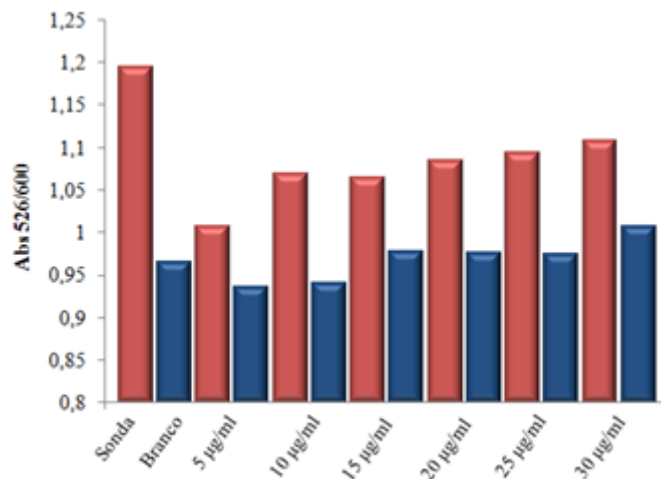
De acordo com os ensaios de estabilidade efectuados, verificou-se que a utilização do  $\text{MgCl}_2$  induziu um maior poder de agregação das nanopartículas comparativamente à utilização do  $\text{NaCl}$ . Tal será devido ao facto do  $\text{Mg}^{2+}$  ser um ião bivalente, enquanto o  $\text{Na}^+$  é um ião monovalente. Deste modo, o  $\text{MgCl}_2$  foi o sal seleccionado para a optimização subsequente da hibridação das nanossondas com sequências de DNA. A concentração óptima de  $\text{MgCl}_2$  para provocar a agregação das Au-nanossondas foi determinada: 0,04 M para a nanossonda dirigida para os membros do complexo (gComplex); e 0,07 M para as sondas dirigidas para *M. tuberculosis* (gMTub) e para *M. bovis* (gMBov).

#### *Análise da detecção de alvos específicos*

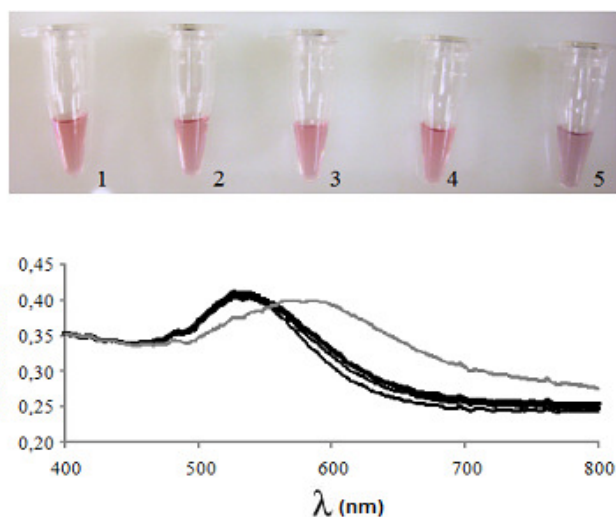
As nanossondas sintetizadas e caracterizadas foram avaliadas em termos da sua capacidade de identificação das respectivas sequências complementares, neste caso, de fragmentos do gene *gyrB* amplificados por PCR.

Numa primeira fase, pretendendo-se determinar uma concentração de DNA adequada para a obtenção de um sinal discriminatório, procederam-se ensaios de detecção com diferentes quantidades de DNA. Foi determinada a concentração mínima de DNA alvo complementar capaz de estabilizar cada nanossonda após a respectiva hibridação e aumento da força iónica do meio (Figura 3.8), tornando possível a detecção colorimétrica específica (Figura 3.9). Para tal, foi testado um conjunto de concentrações de DNA alvo para cada uma das três nanossondas, entre 5 e 30  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3.8). Após hibridação das nanossondas com os respectivos fragmentos de amplificação do gene *gyrB*, foi determinado o espectro UV/Vis da suspensão. Com base nos espectros obtidos após o ensaio, foi calculado o rácio entre a absorvância a 526 nm (pico de SPR representativo da contribuição da fracção não agregada das nanossondas de ouro) e a absorvância a 600 nm (contribuição da fracção agregada das nanossondas de ouro). Um valor para este rácio igual a um pode ser considerado como o ponto de equilíbrio entre a nanossonda agregada e não-agregada e, conseqüentemente, o *threshold* para se poder considerar o positivo e o negativo na discriminação das sequências. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a sonda para o complexo *M. tuberculosis* é capaz de diferenciar entre alvo complementar e não-complementar para todas as concentrações testadas. Todavia, obtém-se uma melhor diferenciação para uma concentração de DNA alvo de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3.8); o mesmo se sucedeu para a sonda

dirigida para *M. bovis*. Já a sonda específica para *M. tuberculosis* necessita de ser testada com uma concentração de DNA alvo de 30 µg/ml. Estas foram as concentrações ótimas determinadas, usadas depois nos ensaios subsequentes.



**Figura 3.8.** Ensaios de especificidade da sonda dirigida para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A agregação das nanossondas foi medida através do rácio de agregação (rácio da intensidade da SPR a 526 nm e 600 nm) das misturas de cada ensaio. As colunas a vermelho representam o alvo complementar (nanossondas de ouro não-agregadas) – *M. tuberculosis* ATCC 25177; as colunas a azul representam o alvo não-complementar (nanossonda de ouro agregada) – *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291. Sonda sozinha sem adição de sal (Sonda); sonda com adição de sal (0,04 M de MgCl<sub>2</sub>) e sem alvo (Branco).

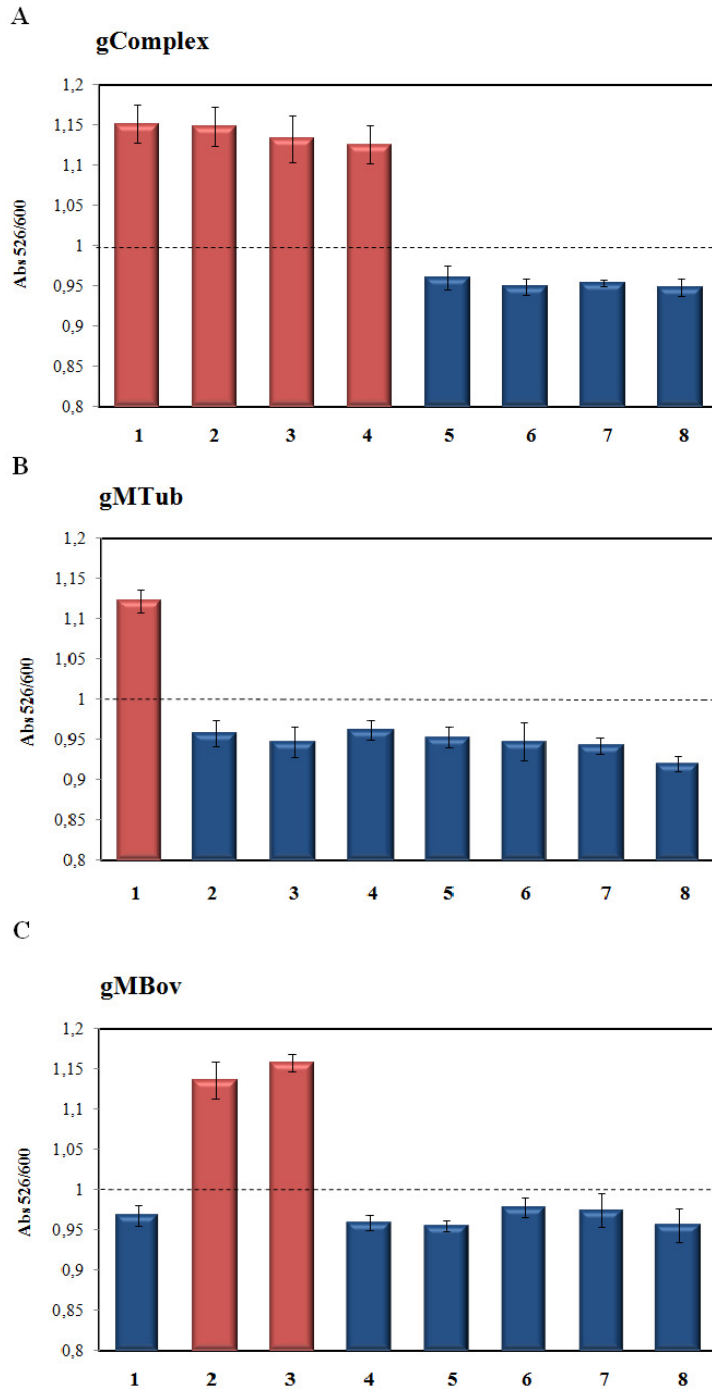


**Figura 3.9.** Método colorimétrico (em cima) e respectiva espectrofotometria (em baixo) para a sonda dirigida para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As linhas a negro representam as soluções de cor vermelha associadas ao alvo complementar (nanossondas de ouro não-agregadas). A linha a cinzento representa a solução azul associada ao alvo não-complementar (nanossonda de ouro agregada). Estirpes analisadas: *M. tuberculosis* ATCC 25177 (1); *M. bovis* LNIV 13027 (2) e LNIV 5530/0/05 (3); *M. caprae* LNIV 17320 (4); e *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 (5).

### *Padrões de agregação das nanossondas de ouro*

Uma vez estabelecidas as condições experimentais necessárias para uma correcta identificação das espécies do MTC, foram testadas várias estirpes com o sistema de nanossondas desenvolvido, utilizando as três nanossondas em paralelo. A sonda específica do MTC (gComplex) permitiu assim identificar claramente os membros deste complexo utilizados neste trabalho, enquanto claramente identificou as espécies pertencentes ao Complexo *M. avium* (MAC) e *Corynebacterium striatum* como membros exteriores ao MTC (Figura 3.10; Tabela 3.4). Do mesmo modo, a sonda dirigida para *M. tuberculosis* (gMTub) identificou inequivocamente todas as estirpes de *M. tuberculosis*, assim como a sonda para *M. bovis* (gMBov) identificou todas as estirpes de *M. bovis* (Figura 3.10; Tabela 3.4). A variação entre os ensaios individuais demonstra um desvio mínimo entre eles, tal como demonstrado na Figura 3.10.

De notar que as sequências nucleotídicas correspondentes às espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis*, baseadas numa região específica do gene *gyrB*, diferem apenas numa diferença nucleotídica na extremidade 3', todavia, foi possível a discriminação entre estas espécies com base num único *mismatch*, e as espécies micobacterianas mais próximas. Isto demonstra a grande especificidade destas nanossondas e, conseqüentemente, do sistema de identificação molecular desenvolvido.



**Figura 3.10.** Diferenciação entre os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando nanossondas de ouro coloidal. A agregação das nanossondas foi medida através do rácio de agregação (rácio da intensidade da SPR a 526 nm e 600 nm) das misturas de cada ensaio. A linha a tracejado representa o *threshold* = 1, considerado como o valor de discriminação entre o Positivo e o Negativo. **A** - detecção com a sonda para Complexo *M. tuberculosis* ([DNA] = 10 µg/ml, depois de 15 min de incubação com [MgCl<sub>2</sub>] = 0,04 M); **B** - detecção com a sonda para *M. tuberculosis* ([DNA] = 30 µg/ml, depois de 15 min de incubação com [MgCl<sub>2</sub>] = 0,07 M); **C** - detecção com a sonda para *M. bovis* ([DNA] = 10 µg/ml, depois de 15 min de incubação com [MgCl<sub>2</sub>] = 0,07 M). As colunas representam a média do rácio obtido com todas as estirpes testadas, e respectivos triplicados, de: *M. tuberculosis* (1); *M. bovis* (2); *M. bovis* BCG (3); *M. caprae* (4); *M. avium* subsp. *avium* (5); *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (6); *M. avium* subsp. *hominissuis* (7); e *Corynebacterium striatum* (8). As barras de erro em cada coluna representam o desvio padrão.

**Tabela 3.4.** Resultados dos ensaios de todas as estirpes utilizadas neste estudo com o sistema de identificação baseado em nanossondas de ouro

Espécie	Estirpe*	gComplex	gMTub	gMBov
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 LNIV 9605	+	+	-
<i>M. bovis</i>	AN5 LNIV: 13027; 5530/0/05; 11265; 7230/4; 14421/2; 24497/6; 8855; 5889; 10044; 14577; 13280/6; 13280/4; 34875; 20564	+	-	+
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 27291	+	-	+
<i>M. caprae</i>	LNIV: 17320; 4958/0/05; 8403; 15244; 20752	+	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC 25291	-	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	LNIV 39888	-	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	LNIV 23063/4	-	-	-
<i>Corynebacterium striatum</i>	LNIV 12352	-	-	-

\*ATCC, *American Type Culture Collection*; LNIV, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal.  
+, POSITIVO (ausência de agregação).  
-, NEGATIVO (agregação).

Este sistema foi testado com sucesso com várias estirpes de referência e isolados clínicos, incluindo espécies micobacterianas e não-micobacterianas (Tabela 3.4). Adicionalmente, também foi efectuada a identificação de 15 estirpes de micobactérias num formato de teste cego (*blind test*). Estas estirpes foram isoladas a partir de 15 amostras biológicas, tendo o DNA extraído das mesmas sido testado em paralelo por PCR-RFLP do gene *gyrB*, no LNIV, e por hibridação com as nanossondas de ouro, neste trabalho. O resultado da identificação foi 100% concordante entre ambos os métodos, tendo todas as estirpes sido identificadas como *M. bovis* (Tabela 3.5).

**Tabela 3.5.** Identificação de isolados clínicos de micobactérias com nanossondas de ouro num formato de teste cego (*blind test*)

Amostra n°	gComplex	gMTub	gMBov	Resultado*	Identificação (PCR-RFLP)	N° de estirpe atribuído
1	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 17010
2	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 21136
3	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 19489
4	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 20331
5	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 20332
6	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 20408
7	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28840/2
8	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28646
9	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28430
10	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 26807
11	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28472
12	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28473
13	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 28843
14	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 29577/1
15	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	LNIV 29968

\*, Integração dos resultados da análise das amostras através do uso das três Au-nanossondas; +, POSITIVO (ausência de agregação); -, NEGATIVO (agregação).

O sistema de identificação desenvolvido neste trabalho, baseado na utilização de nanossondas de ouro, é fácil de executar e não necessita de equipamento laboratorial muito complexo ou dispendioso. Depois da amplificação do gene *gyrB* por PCR, a detecção dos fragmentos amplificados com o sistema das nanossondas de ouro demora apenas 15 minutos, originando um resultado colorimétrico com grande especificidade e sensibilidade (Sato *et al.*, 2003;

Baptista *et al.*, 2005; Baptista *et al.*, 2006; Doria *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008). Apesar deste resultado ser passível, na maior parte dos casos, de ser registado a olho nu, a detecção da ocorrência da agregação ou não-agregação das nanossondas torna-se bastante mais eficiente e quantificável através da realização de uma análise espectrofotométrica, nomeadamente utilizando um leitor de microplacas. De facto, usando a função fotométrica do leitor de microplacas, cada amostra necessita de apenas um segundo para ser analisada e o seu rácio de agregação calculado.

Futuros desenvolvimentos do método desenvolvido neste trabalho deverão passar pelo desenho de nanossondas para outras espécies importantes do MTC, como por exemplo *M. caprae*, e a substituição do passo de PCR por uma reacção isotérmica de amplificação de ácidos nucleicos, tecnologicamente menos exigente. Adicionalmente, um próximo passo deverá envolver também a aplicação da técnica desenvolvida directamente a partir de amostras biológicas animais, como macerados de órgãos, de modo a tornar possível um diagnóstico mais rápido e sensível da tuberculose bovina. A possibilidade de adaptação deste tipo de detecção baseado em nanossondas a uma plataforma tecnológica portátil está a ser estudada (Silva *et al.*, 2007), tornando este sistema também passível de ser utilizado em campo, fora do ambiente laboratorial.

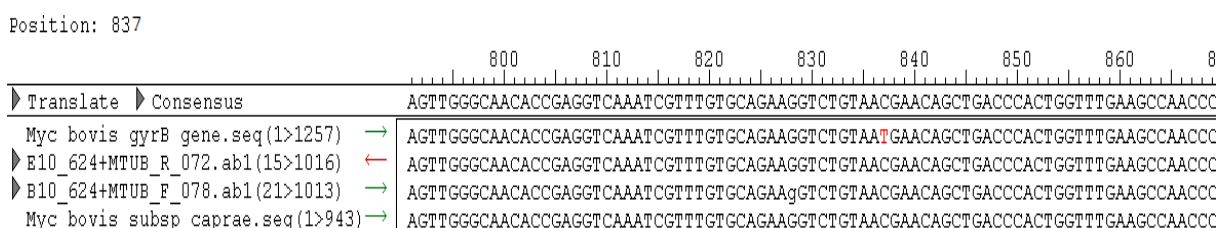
### **3.4. Análise da estirpe *Mycobacterium caprae* LNIV 20752**

Durante a realização do trabalho surgiu a dúvida se a estirpe LNIV 20752 pertencia à espécie *M. caprae* ou *M. bovis*. Esta estirpe já tinha anteriormente suscitado algumas dúvidas no LNIV em relação à sua identificação. Através da análise do gene *gyrB* desta estirpe por PCR-RFLP a mesma indicava um padrão de restrição concordante com a espécie *M. bovis*. Em contraste, quando analisada pela técnica de *spoligotyping*, uma técnica de tipagem molecular muito usada para estas espécies de *Mycobacterium* baseada na análise de polimorfismos de regiões repetidas (DRs, do Inglês *Direct Repeats*), a estirpe LNIV 20752 apresentava um padrão concordante com o da espécie *M. caprae*.

Esta estirpe foi assim seleccionada para ser testada com os métodos moleculares estudados no decorrer deste trabalho. O fragmento específico de 1020 pb do gene *gyrB* foi amplificado por PCR para esta estirpe, confirmando tratar-se de uma espécie pertencente ao MTC. Posto isto, realizou-se a análise das RDs por PCR. O padrão de presença/ausência das RDs obtido

mostrou-se característico da espécie *M. caprae*, isto é, as RD1 e RD4 estavam presentes e a RD9 ausente. Esta estirpe foi ainda testada com o sistema de nanossondas de ouro, sendo positiva para a sonda do MTC e negativa para as sondas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, eliminando assim também a hipótese de pertencer à espécie *M. bovis*. Os resultados anteriores evidenciam portanto que a estirpe LNIV 20752 pertence à espécie *M. caprae*.

Os resultados anteriores colocam em causa a identificação da estirpe LNIV 20752 pelo método de PCR-RFLP do gene *gyrB*, que tanto quanto sabemos foi repetida por diversas vezes no LNIV. Tal poderia dever-se a uma mutação pontual nos locais de restrição do gene *gyrB* reconhecidos pelas enzimas utilizadas nesta técnica. Para confirmar a ocorrência, ou não, de uma mutação deste género, o gene *gyrB* desta estirpe foi amplificado e a respectiva sequência nucleotídica foi determinada pela empresa STAB Vida Lda. O alinhamento desta sequência com as sequências de estirpes de referência do MTC permitiu observar que os locais de reconhecimento das enzimas de restrição usadas, especialmente da enzima *SacII*, estavam intactos e concordantes com os da espécie *M. caprae* (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Resultados da sequenciação do gene *gyrB* da estirpe *M. caprae* LNIV 20752 e respectiva análise comparativa com sequências de estirpes de referência. Sequências de *M. bovis* e de *M. caprae* retiradas do GenBank com os números de acesso AB014184 e AJ276122, respectivamente. A vermelho encontra-se o SNP que diferencia *M. bovis* de *M. caprae*, posicionado no local de restrição da enzima *SacII*.

Conclui-se assim que o isolado de *Mycobacterium* que usámos neste trabalho, catalogado com o número de coleção LNIV 20752, pertence de facto à espécie *M. caprae*. Não se encontrou qualquer explicação óbvia para que as análises por PCR-RFLP do gene *gyrB* feitas anteriormente no LNIV tenham originado sempre resultados concordantes com os da espécie *M. bovis*. Uma potencial causa desta discrepância poderia envolver a ocorrência de uma contaminação cruzada, das culturas ou dos respectivos DNAs extraídos, aquando da realização dos testes. Sugere-se assim que a pureza da cultura da estirpe testada na altura seja

confirmada, que o seu DNA genómico seja novamente extraído e que a reacção de PCR-RFLP seja repetida com novos lotes de enzimas de restrição.

### **3.5. Sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares estudados**

Neste trabalho, desenvolveram-se várias estratégias moleculares para uma correcta identificação das espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e para a diferenciação entre os seus principais membros. Numa primeira abordagem, foi otimizada a amplificação do gene *gyrB* por PCR usando *primers* específicos para o MTC. Como esperado, foi amplificado um fragmento de 1020 pb específico do gene *gyrB*, a partir de todas as estirpes de espécies pertencentes ao MTC. Esta reacção de PCR revelou-se assim específica e sensível para a detecção de todas as espécies deste complexo. A segunda abordagem consistiu na amplificação de Regiões de Diferença (RDs) específicas por PCR. Cada espécie do MTC apresentou um padrão específico de presença e/ou ausência das RDs seleccionadas neste trabalho, permitindo assim diferenciar os seus principais membros, nomeadamente: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae* e a estirpe vacinal de *M. bovis* BCG. Esta metodologia demonstrou ser também sensível e específica para a identificação destas espécies. Por último, na terceira abordagem desenvolveu-se um método de identificação baseado em dois passos: (i) amplificação por PCR do gene *gyrB*; e (ii) hibridação dos fragmentos amplificados com nanossondas de ouro específicas, uma dirigida para as espécies do MTC, outra para *M. tuberculosis* e outra para *M. bovis*. Este método possibilitou também uma identificação inequívoca destas espécies micobacterianas, usando um processo de detecção colorimétrico simples e rápido.

Apesar do aumento de micobactérias pertencentes ao MTC isoladas a partir de amostras clínicas, animais e humanas, a identificação utilizada em rotina usualmente não consegue identificar as estirpes ao nível da espécie. Torna-se assim premente o desenvolvimento de metodologias moleculares rápidas, eficientes e fáceis de executar que permitam distinguir estas micobactérias. As diversas estratégias da genómica comparativa têm demonstrado que as sequências dos bacilos de *Mycobacterium*, com especial ênfase para os membros do MTC, podem providenciar marcas moleculares distintas que permitem uma identificação conclusiva dos isolados ao nível da espécie (Niemann *et al.*, 2000; Brosch *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2005; Warren *et al.*, 2006). A compreensão total do espectro e epidemiologia da doença

causada por estas micobactérias requer uma avaliação molecular dos isolados ao nível da espécie. Deste modo, métodos de identificação como os descritos neste trabalho podem providenciar uma importante ajuda para a realização dessa tarefa.

#### 4. Considerações finais

A incidência da tuberculose em todo o mundo ainda não está totalmente determinada, particularmente a incidência da patologia provocada pelas espécies zoonóticas *Mycobacterium bovis* e *M. caprae* e por outras espécies aparentemente menos frequentes do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Na verdade, o diagnóstico laboratorial convencional da tuberculose não diferencia, em rotina, entre as espécies deste complexo. Com recurso a métodos moleculares é hoje possível uma efectiva discriminação entre os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e sua detecção a partir de material infectado, recorrendo por exemplo à análise de polimorfismos do gene *gyrB* ou das Regiões de Diferença (RDs) no genoma destas espécies. Adicionalmente, técnicas como o *spoligotyping* e a tipificação por MIRU-VNTR permitem tipificar intra-especificamente os membros do complexo e contribuir para o estudo da sua epidemiologia, desde que correctamente enquadradas num algoritmo de diagnóstico laboratorial. Passados dez anos sobre a publicação da sequência completa do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* e cinco anos sobre a sequenciação do genoma de *M. bovis*, novas abordagens para a identificação e tipificação dos membros do MTC continuam hoje a ser propostas. Os métodos moleculares revelam-se promissores para um diagnóstico mais rápido e específico da tuberculose animal e humana, contudo é necessário torná-los mais simples, acessíveis e estandardizados para uma utilização mais ampla e efectiva na rotina clínica laboratorial.

Este trabalho pretendeu dar um pequeno contributo neste sentido, tendo-se optimizado e desenvolvido métodos moleculares relativamente simples que permitem identificar de modo rápido e eficiente as principais espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; dois métodos baseados em PCR para a amplificação de uma região específica do gene *gyrB* e para a análise de RDs específicas e um terceiro método de detecção molecular baseado na hibridação de Au-nanossondas com sequências de DNA alvo específicas. O primeiro método permitiu a identificação das espécies pertencentes ao MTC; os dois últimos métodos possibilitaram a diferenciação dos principais membros deste complexo. Estes métodos foram testados com estirpes de referência e isolados clínicos, revelando ser sensíveis e específicos (Anexo I).

Mas mais do que voltar a repetir e discutir os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se, nas considerações finais desta Dissertação, levantar algumas questões e modestamente contribuir para o lançar de pistas de trabalho futuro. Deste modo, um desenvolvimento natural do trabalho apresentado nesta dissertação passa necessariamente pela adaptação das técnicas descritas à análise directa de amostras biológicas. A detecção molecular específica e rápida de *M. bovis* e de outras espécies micobacterianas directamente nas amostras, como por exemplo em macerados de tecidos, será deveras importante para melhorar o diagnóstico da tuberculose animal e, assim, contribuir para um controlo e erradicação mais eficientes desta doença no nosso país. É de realçar que a tecnologia de PCR em tempo real tem sido avaliada no diagnóstico de tuberculose humana, mas são escassos os estudos sobre a sua aplicação ao diagnóstico de tuberculose animal. Seria interessante otimizar a aplicação deste tipo de tecnologias com base nos alvos genómicos já caracterizados neste trabalho, como as Regiões de Diferença e mesmo o gene *gyrB*. Por outro lado, o desenvolvimento de métodos rápidos e autónomos de diagnóstico, independentes da utilização de equipamentos dispendiosos ou sofisticados, será também muito relevante. A reacção de PCR é um factor limitante neste aspecto. Deste modo, como já atrás referido nesta dissertação, será bastante interessante estudar as possibilidades de substituição deste passo no procedimento experimental de identificação dos membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* com nanossondas de ouro coloidal. Particularmente promissores para analisar são as tecnologias isotérmicas de detecção e amplificação específica de ácidos nucleicos. A aplicação destes métodos simplificados será particularmente interessante nos laboratórios com menores recursos e nos países em vias de desenvolvimento, onde a tuberculose é ainda uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade.

Por último, uma vez desenvolvidas e avaliadas alternativas eficazes para a detecção e identificação rápida dos membros do complexo *M. tuberculosis*, seria interessante avaliar, com estas novas ferramentas, a real importância da tuberculose de origem zoonótica em Portugal. Tal estudo ainda não foi feito no nosso país, apesar deste aspecto estar já mais ou menos caracterizado noutras regiões do globo. Tal estudo implicará, como referido no início destas considerações, o desenvolvimento de projectos de investigação na interface da tuberculose animal e humana, com base numa cooperação estreita entre entidades de investigação dedicadas à saúde animal e humana. Este tipo de cooperação, na verdadeira acepção do conceito “*One World, One Health*” proposto recentemente pela OIE e WHO,

permitirá certamente alcançar um maior e melhor conhecimento sobre a epidemiologia da tuberculose no nosso país, com especial ênfase para os aspectos zoonóticos desta doença.

## 5. Referências Bibliográficas

- Acha, P.N., e Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 ed. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, p 28-56.
- Alland, D., Lacher, D.W., Hazbon, M.H., Motiwala, A.S., Qi, W., Fleischmann, R.D. e Whittam, T.S. 2007. The role of large sequence polymorphisms in generating genomic diversity in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their utility in phylogenetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46: 39-46.
- Amado, A., Albuquerque, T., Goncalves, A., Duarte, E., Botelho, A., Fernandes, T., Bernardino, R. e Lapão, N. 2006. Tuberculosis in mandrills at the Lisbon zoo. *Vet. Rec.* 159: 643.
- Amaro, A., Duarte, E., Amado, A., Ferronha, H. e Botelho, A. 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 8-11.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A. e Dominguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53: 1785-1789.
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. e Dominguez, L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 49: 1263-1273.
- Baker, L., Brown, T., Maisetti, J. e Drobniewski, F.A. 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1568-1577.
- Baptista, P., Doria, G., Henriques, D., Pereira, E. e Franco, R. 2005. Colorimetric detection of eukariotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J. Biotechnol.* 119: 111-117.
- Baptista, P., Koziol-Montewka, M., Paluch-Oles, J., Doria, G. e Franco, R. 2006. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clin. Chem.* 52: 1433-1434.
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P. e Franco, R. 2008. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 943-950.
- Barouni, A.S., Augusto, C.J., Lopes, M.T.P., Zanini, M.S. e Salas, C.E. 2004. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell. Probes* 18: 167-170.

- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S. e Small, P.M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-1523.
- Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Smith, D., Bancroft, G., Clark, S., Williams, A., Leclerc, C. e Cole, S. 2004. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant *Mycobacterium microti* vaccine that induces T Cell immunity against region of difference 1 antigens. *J. Infect. Dis.* 190: 115-122.
- Brosch, R., Garnier, T. e Cole, S.T. 2000. Comparative genomics of the Mycobacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 143-152.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B.G. e Cole, S.T. 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect. Immunity* 66: 2221-2229.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Van Soolingen, D. e Cole, S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3684-3689.
- Cheng, V.C., Yew, W.W. e Yuen, K.Y. 2005. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 711-720.
- Cole, S.T., Brosch, R. e Parkhill, J. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I. e Meslin, F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59-70.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M. e Bernardelli, A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53: 1305-1314.
- David, S., Portugal, C., Antunes, A., Cardoso, A., Calado, A., Barros, V. e Sancho, L. 2005. Identificação molecular pelo método de spoligotyping de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca. *Rev. Port. Pneumol.* 10: 195-204.
- Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700-707.
- Doria, G., Franco, R. e Baptista, P. 2007. Nanodiagnosics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. *IEE Proc. Nanobiotechnol.* 1: 53-57.

- Drobniewski, F., Caws, M., Gibson, A. e Young, D. 2003. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 3: 141-147.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A. e Botelho, A. 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.* 130: 415-421.
- Eaton, P., Doria, G., Pereira, E., Baptista, P. e Franco, R. 2007. Imaging gold nanoparticles for DNA sequence recognition in biomedical applications. *IEEE Trans. Nanobioscience* 6: 282-288.
- Elhay, M.J., Oettinger, T. e Andersen, P. 1998. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect. Immun* 66: 3454-3456.
- Ellis, M.D., Davies, S., McCandlish, I.A.P., Monies, R., Jahans, K. e Rua-Domenech, R. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *Vet. Rec.* 159: 46-48.
- Etter, E., Donado, P., Jori, F., Caron, A., Goutard, F. e Roger, F. 2006. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081: 61-73.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P.M. e Sonnenberg, P. 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369: 1270-1276.
- Fabre, M., Koeck, J.L., Le Fleche, P., Simon, F., Herve, V., Vergnaud, G. e Pourcel, C. 2004. High genetic diversity revealed by Variable-Number Tandem Repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". *J. Clin. Microbiol.* 42: 3248-3255.
- Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Umayam, L.A., Ermolaeva, M., Salzberg, S.L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs, W.R., Jr., Venter, J.C. e Fraser, C.M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory Strains. *J. Bacteriol.* 184: 5479-5490.
- Francisco, J., Baptista, P. e Rueff, J. 2007. Gold nanoparticle based systems in genetics. *Curr. Pharmacogenomics* 5: 39-47.
- Gannon, B.W., Hayes, C.M. e Roe, J.M. 2007. Survival rate of airborne *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.* 82: 169-172.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V. e Hewinson, R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS* 100: 7877-7882.

Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. e Cole, S.T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32: 643–655.

Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P. e Liz-Marzán, L.M. 2008. Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 37: 1783-1791.

Gutacker, M.M., Smoot, J.C., Migliaccio, C.A.L., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N. e Musser, J.M. 2002. Genome-wide analysis of synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162: 1533-1543.

Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Bahia, O., Marmiesse, M., Supply, P. e Vincent, V. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 1: 5.

Haas, W.H., Bretzel, G., Amthor, B., Schilke, K., Krommes, G., Rusch-Gerdes, S., Groh, V. e Bremer, H.J. 1997. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. *J. Clin. Microbiol.* 35: 663-666.

Horwitz, M.A., Lee, W.E., Dillon, B.J. e Harth, G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1530-1534.

Huard, R.C., Fabre, M., de Haas, P., Claudio Oliveira Lazzarini, L., Van Soolingen, D., Cousins, D. e Ho, J.L. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Bacteriol.* 188: 4271-4287.

Huard, R.C., Lazzarini, L.C.O., Butler, W.R., van Soolingen, D. e Ho, J.L. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1637-1650.

Huber, M., Wei, T.F., Müller, U.R., Lefebvre, F.A., Marla, S.S. e Bao, Y.P. 2004. Gold nanoparticle probe-based gene expression analysis with unamplified total human RNA. *Nucleic Ac. Res.* 32: 137.

Jain, K., 2003. Nanodiagnosics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3: 153-161.

Kantor, I.N. e Ritacco, V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40: 5-14.

Karboul, A., Gey Van Pittius, N., Namouchi, A., Vincent, V., Sola, C., Rastogi, N., Suffys, P., Fabre, M., Cataldi, A., Huard, R., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Ho, J., Gutierrez, M.C. e Mardassi, H. 2006. Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE-PGRS duplicated gene pair. *BMC Evol. Biol.* 6: 107.

Kasai, H., Ezaki, T. e Harayama, S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38: 301-308.

- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. e Plech, A. 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B* 110: 15700-15707.
- Kremer, K., Van Soolingen, D., Van Embden, J., Hughes, S., Inwald, J. e Hewinson, G. 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2793-2794.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S. e Niemann, S. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3070-3077.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. e Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lee, P.C. e Meisel, D. 1982. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* 86: 3391-3395.
- Lewerin, S.S., Olsson, S.L., Eld, K., Roken, B., Ghebremichael, S., Koivula, T., Kallenius, G. e Bolske, G. 2005. Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet. Rec.* 156: 171-175.
- Liebana, E., Aranaz, A., Dominguez, L., Mateos, A., Gonzalez-Llamazares, O., Rodriguez-Ferri, E.F., Domingo, M., Vidal, D. e Cousins, D. 1997. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet. Microbiol.* 54: 223-233.
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J. e Huo, Q. 2007. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58: 3-7.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. e Stover, C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178: 1274-1282.
- Malone, F.E., Wilson, E.C., Pollock, J.M. e Skuce, R.A. 2003. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. *J. Vet. Med. Series B* 50: 500-504.
- Michel, A.L., Venter, L., Espie, I.W. e Coetzee, M.L. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the national zoological gardens of South Africa, 1991-2001. *J. Zoo Wildlife Med.* 34: 364-370.
- Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic, R.C. e Storhoff, J.J. 1996. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382: 607-609.
- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D.S., Katoch, V.M., Srivastava, K., Thakral, S.S., Bharadwaj, S.S., Sreenivas, V. e Prasad, H.K. 2005. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5670-5678.

- Monies, B., Rua-Domenech, R. e Jahans, K. 2006. Bovine tuberculosis in cats. *Vet. Rec.* 158: 490-491.
- Montali, R., Mikota, S. e Cheng, L. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *OIE Sci. Tech. Rev.* 20: 291-303.
- Monteros, L.E.E., Galan, J.C. e Gutierrez, M. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 36: 239-242.
- Moser, I., Prodingler, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D., Gomis, D., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Wuennemann, K. e Moisson, P. 2008. *Mycobacterium pinnipedii*: Transmission from South American sea Lion (*Otaria byronia*) to Bactrian Camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan Tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet. Microbiol.* 127: 399-406.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A. e Behr, M. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* 186: 74-80.
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D. e Behr, M.A. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 187: 6386-6395.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rusch-Gerdes, S. e Richter, E. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3231-3234.
- O'Reilly, L.M. e Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 76: 1-46.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A. e Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74: 1-15.
- Pinsky, B.A. e Banaei, N. 2008. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2241-2246.
- Prabhakar, S., Mishra, A., Singhal, A., Katoch, V.M., Thakral, S.S., Tyagi, J.S. e Prasad, H.K. 2004. Use of the *hupB* gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2724-2732.
- Rastogi, N. e Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *OIE Sci. Tech. Rev.* 20: 21-54.
- Reviriego Gordejo, F.J. e Vermeersch, J.P. 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet. Microbiol.* 112: 101-109.

- Rosenkrands, I., Rasmussen, P.B., Carnio, M., Jacobsen, S. e Theisen, M. 1998. Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. *Infect. Immun.* 66: 2728-2735.
- Rua-Domenech, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 77-109.
- Sato, K., Hosokawa, H. e Maeda, M. 2003. Rapid Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by Non-Cross-Linking DNA Hybridization. *J. Amer. Chem. Soc.* 125: 8102-8103.
- Sato, K., Onoguchi, M., Sato, Y., Hosokawa, K. e Maeda, M. 2006. Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation for sensitive detection of single-nucleotide polymorphisms: Optimization of the particle diameter. *Anal. Biochem.* 350: 162-164.
- Scorpio, A. e Zhang, Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Med.* 2: 662-667.
- Silva, L.B., Baptista, P., Raniero, L., Doria, G., Martins, R. e Fortunato, E. 2007. Characterization of optoelectronic platform using an amorphous/nanocrystalline silicon biosensor for the specific identification of nucleic acid sequences based on gold nanoparticle probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 132: 508-511.
- Smith, N.H., Gordon, S.V., Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S. e Hewinson, R.G. 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 670-681.
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R. e Gordon, S.V. 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 537-44.
- Springer, B., Sander, P., Sedlacek, L., Hardt, W.D., Mizrahi, V., Schar, P. e Bottger, E.C. 2004. Lack of mismatch correction facilitates genome evolution in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 53: 1601-1609.
- Sreevatsan, S., Escalante, P., Pan, X., Gillies, A., Siddiqui, S., Khalaf, C.N., Kreiswirth, B.N., Bifani, P., Adams, L.G., Ficht, T., Perumaalla, V.S., Cave, M.D., Van Embden, J.D. e Musser, J.M. 1996. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2007-2010.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S. e Musser, J.M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *PNAS* 94: 9869-9874.
- Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A. e Letsinger, R.L. 1998. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Amer. Chem. Soc.* 120: 1959-1964.

- Takayama, K., Wang, C. e Besra, G.S. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Rev. 18: 81-101.
- Tekaia, F., Gordon, S.V., Garnier, T., Brosch, R., Barrell, B.G. e Cole, S.T. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. Tuber. Lung Dis. 79: 329-342.
- Thaxton, C.S., Georganopoulou, D.G. e Mirkin, C.A. 2006. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. Clin. Chim. Acta 363: 120-126.
- Thoen, C., LoBue, P. e DeKantor, I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet. Microbiol. 112: 339-345.
- Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M. e Van Embden, J.D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int. J. System. Evol. Microbiol. 47: 1236-1245.
- Van Soolingen, D., Van der Zanden, A.G., De Haas, P., Noordhoek, G.T., Kiers, A., Foudraine, N.A., Portaels, F., Kolk, A.H., Kremer, K. e Van Embden, J.D. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. J. Clin. Microbiol. 36: 1840-1845.
- Vincent, V., Brown-Elliot, B., Kenneth, J.J. e Wallace, R.J.Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. In *Manual of Clinical Microbiology* ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. e Tenover, R.H.. American Society for Microbiology, Washington DC, EUA, pp. 560-584.
- Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Brnard, M., Hesseling, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G. e van Helden, P.D. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 10:818-822.
- Wilson, R. 2008. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. Chem. Soc. Rev. 37: 2028-2045.
- Zink, A.R., Molnar, E., Motamedi, N., Palfy, G., Marcsik, A. e Nerlich, A.G. 2007. Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. Int. J. Osteoarchaeol. 17: 380-391.
- Zumárraga, M.J., Bernardell, A., Bastida, R., Quse, V., Loureiro, J., Cataldi, A., Bigi, F., Alito, A., Castro Ramos, M., Samper, S., Otal, I., Martin, C. e Romano, M.I. 1999. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. Microbiology 145: 2519-2526.

## Anexo I

### Resultados da análise das espécies pertencentes ao MTC através dos métodos moleculares utilizados no trabalho

Espécie	Estirpe	<i>gyrB</i> -PCR	RDs				Au-nanossondas			Resultado*	Identificação (PCR-RFLP)
			RD1	RD4	RD9	ESAT6	gComplex	gMTub	gMBov		
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 LNIV 9605	✓	+	+	+	+	+	+	-	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i>	AN5 LNIV: 13027; 5530/0/05; 11265; 7230/4; 14421/2; 24497/6; 8855; 5889; 10044; 14577; 13280/6; 13280/4; 34875; 20564	✓	+	-	-	+	+	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 27291	✓	-	-	-	-	+	-	+	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG
<i>M. caprae</i>	LNIV: 17320; 4958/0/05; 8403; 15244; 20752	✓	+	+	-	+	+	-	-	<i>M. caprae</i>	<i>M. caprae</i>

\*, Resultados integrados da análise das espécies pertencentes ao MTC através das metodologias moleculares utilizadas durante o trabalho. Os resultados finais foram confirmados com os resultados obtidos previamente pela técnica de PCR-RFLP.

✓ , POSITIVO (amplificação).

+ , POSITIVO (ausência de agregação).

- , NEGATIVO (agregação).