



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Leptospirose humana na Província da  
Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes assistidos no  
Hospital Central Dr. António Agostinho Neto,  
Lubango (Angola)

**Elsa Graciana Estanislau Ndeyanelao**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS

JANEIRO, 2014



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Leptospirose humana na Província da  
Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes assistidos no  
Hospital Central Dr. António Agostinho Neto,  
Lubango (Angola)

**Autora:** Elsa Graciana Estanislau Ndeyanelao

**Orientadora:** Investigadora Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

JANEIRO, 2014

### **Dedicatória**

Dedico este trabalho a uma pessoa muito especial:  
o meu querido Pai que infelizmente nos deixou, "Que Deus o tenha". É uma pena não  
ter chegado até aos nossos dias, para poder também acompanhar o meu percurso neste  
grande desafio...

Para ti Papá com saudades eternas!!!

Aos que se aventuram pelos  
mistérios da ciência e se encantam  
com a maravilha do eterno  
aprender e ensinar!!!  
*(Autor Anónimo)*



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço em primeiro lugar, a **Deus** todo-poderoso, por me ter dado vida, saúde e oportunidade em saber viver nela, seguindo os seus caminhos! ”*Tanguí Unene Calunga Cangue*”.

À Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, Directora da Unidade de Microbiologia Médica e do Laboratório de Leptospirase e Borreliose de Lyme (L&BL) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT,UNL), orientadora desta dissertação, por acreditar na minha capacidade, e aceitar este desafio, pelos seus conhecimentos e experiência única, o seu entusiasmo sobre as leptospirosas, conseguindo despertar o meu interesse por estas “*meninas-leptospirosas*” como carinhosamente as trata; contribuindo assim para a minha formação profissional e pessoal, além de auxiliar na observação das minhas amostras no microscópio; pela confiança, carinho, atenção incondicional e apoio moral, o meu muito Obrigada.

À Mestre Teresa Carreira, Técnica Superior da Unidade de Microbiologia Médica, adstrita ao L&BL, IHMT, UNL, pelo carinhoso acompanhamento no desenvolvimento dos meus trabalhos práticos no referido laboratório, nas horas boas e más passadas em frente do microscópio e não só, pelos seus ensinamentos, pela paciência, amizade manifestada, sempre pronta em esclarecer as dúvidas surgidas durante o percurso.

Às Mestres, Mónica Nunes e Elsa Fortes, actuais estudantes de doutoramento no L&BL, IHMT, UNL, pelo apoio carinhoso, opiniões sugestivas, sempre prontas nas respostas e esclarecimento no que fosse necessário.

À Céu Mateus, Assistente Operacional do IHMT, UNL, pelo incentivo, apoio moral e pela amizade e por estar sempre pronta a ir buscar, levar e deixar tudo pronto e disponível para o meu trabalho.

Aos colegas do Mestrado em especial à Nádia, Vanessa, Andreia e ao Baltazar pelo apoio, amizade, confiança e partilha de ideias científicas.

À Esmeralda, minha companheira e colega, pelo apoio, amizade e oportunidade de partilha nos bons e maus momentos.

À Zita pelo prestimoso e incondicional apoio moral e não só, pelo carinho e disponibilidade nas suas sugestivas opiniões.

A todos os docentes do IHMT em especial aos da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica, grupo de Virologia com maior destaque para o Prof. Doutor. João Piedade pelo apoio moral, amizade e por sempre me fazer crer que eu era capaz.

Ao Dr. Henrique Chipenda, Director Geral do Hospital Central do Lubango (Huila) Angola, por acreditar e assegurar a minha (nossa) formação e aceitar que este estudo fosse realizado no Hospital que ele dirige, pelo apoio moral e disponibilização dos materiais necessários, utilizados na colheita de amostras.

Ao Dr. Martinho Daniel, Director Científico e Pedagógico do Hospital, por aceitar este desafio apostando na minha (nossa) formação e ainda, pelo seu apoio moral e amizade.

Ao Dr. Lourenço Bento, Director Administrativo do Hospital Central, pela atenção, apoio moral e disponibilidade na impressão dos inquéritos e ao só.

À equipa do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Central do Lubango em especial, à Técnica Isilda Domingos, pela ajuda na realização das colheitas, ao Técnico Enoque de Freitas chefe do Laboratório, por me ter aberto as portas do seu laboratório e por me transmitir a sua experiência profissional.

Ao Enfermeiro José R. L. da Cruz Gomes, chefe dos Serviços do Centro de Aconselhamento do VIH-SIDA (CATV) pelo apoio e amizade em disponibilizar a sua centrífuga.

Ao Dr. Roberto Carlos, Patologista de Análises Clínicas, pelo seu carinho e ajuda na realização das colheitas.

Ao Técnico Alfredo Salvaterra, Chefe da Hemoterapia do Hospital Central, pelo apoio na disponibilidade do frigorífico para a conservação de amostras.

Ao meu querido esposo Pedro Taleingue, aos meus tesouros Etianeid, Etiandro e Etivânia pelo carinho, amor, compreensão, paciência, apoio e por entenderem e aceitarem a minha ausência.

Aos meus queridos irmãos, sobrinhos e à família em geral por estarem sempre ao meu lado apoiando-me, dando coragem, força, alegria e amor para seguir em frente. Um especial obrigado aos ‘meus pais’ (Estanislau e Melânia), por me darem a oportunidade de viver, pela educação, formação moral, liberdade, carinho, atenção e apoio incondicional.

À minha amiga Dra. Lídia Sangongo, pela amizade, carinho, paciência por me ter dispensado o seu tempo, estando no vai e vem em busca do parecer do Comité de Ética de Angola, sobre o meu projecto de investigação.

À Sandra Azevedo funcionária da Divisão Académica do IHMT, UNL pelo carinho, paciência sempre pronta nas orientações e cumprimento dos regulamentos da Instituição.

Aos técnicos informáticos do IHMT, UNL o Dr. António e Dr. Carlos pela paciência e atenção disponibilizada, sempre prontos na orientação e esclarecimentos de dúvidas sobre a informática.

Ao meu compadre Eduardo Fernando, à minha amiga Ana Matias e à senhora Manuela Branquinho pelo apoio e acolhimento aquando da minha chegada e vivência em Lisboa.

Agradeço com maior satisfação aos doentes e seus familiares por terem aceitado participar neste estudo....

A todos quando ajudaram de forma directa ou indirecta.

**o meu muito obrigada!!!!**



## RESUMO

---

A Leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias patogénicas do género *Leptospira*. Ocorre sobretudo nos países em desenvolvimento, em regiões tropicais e subtropicais. Nos últimos anos tem-se tornado um problema emergente de Saúde Pública, afectando uma grande diversidade de mamíferos (hospedeiros), incluindo os humanos. Actualmente observa-se um aumento do número de casos com alterações do padrão epidemiológico, assim como o ressurgimento de surtos epidémicos devido a alterações climáticas. No entanto, devido aos sintomas inespecíficos, o diagnóstico clínico é confundível com outras doenças e o laboratorial é difícil e dispendioso, requerendo recursos e técnicos especializados.

Em Angola (Lubango), o diagnóstico laboratorial não é praticado devido à indisponibilidade de testes específicos, resultando no desconhecimento da sua prevalência. Assim, de modo, a determinar a sero-ocorrência da Leptospirose humana em doentes febris assistidos no Hospital Central do Lubango, contribuindo para: *i*) a possível inclusão desta doença no diagnóstico diferencial de doentes com síndromes febris indeterminados; e *ii*) implementar medidas de prevenção e controlo.

Foram analisadas 300 amostras séricas obtidas em igual número de doentes febris que recorreram ao referido hospital, no período de Setembro a Dezembro de 2012, aos quais também se aplicou um inquérito clínico-epidemiológico. Foi realizada uma avaliação serológica usando a técnica de rastreio (MACROLepto), e a técnica de referência (Técnica de Aglutinação Microscópica; TAM). Para a análise molecular usou-se a Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR), em soro utilizando *primers* baseados no gene *hap1* (para leptospiros patogénicas). Os produtos amplificados foram sequenciados para determinação de espécies genómicas de *Leptospira*.

A amostra populacional foi constituída por indivíduos do género masculino (111; 37%) e (189; 63%) do género feminino. A suspeita clínica de Leptospirose foi confirmada serologicamente pela TAM em (120<sup>+</sup>/300; 40%) dos doentes, e a análise por PCR foi positiva em (30<sup>+</sup>/193; 16%) das amostras analisadas. A sequenciação do DNA obtido permitiu identificar três espécies genómicas: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* e *L. kirschneri*.

Os participantes no estudo foram distribuídos por grupos etários, e a média de idade foi de 30 anos, sendo os grupos (11-20 e 21- 30 anos) os mais representados, e o género feminino o mais afectado (61%). As principais manifestações clínicas foram a febre (91%), cefaleias (84%) e mialgias (59%).

Em relação as variáveis de risco de infecção por *Leptospira* spp., verificou-se que a ausência de saneamento básico, exposição aos lixos, presença de roedores próximos das populações e o consumo de água não tratada, foram as situações mais referidas. O contacto com os roedores, seguido dos canídeos, foi referido por 97% e 41% dos doentes com resultado positivo.

Quanto à proveniência, a maioria dos doentes veio de áreas suburbanas.

No que respeita à ocupação destacaram-se as mulheres camponesas, estudantes e domésticas.

Os soros com resultado positivo mostraram reactividade específica para leptospiros de 19 serogrupos (serovares) com maior destaque, Icterohaemorrhagiae (Copenhageni), Hebdomadis, Javanica (Poi) Australis (Bratislava) e Sejroe (Hardjobovis). O título mais elevado foi de 1:800 observado para os serovares Copenhageni, Ballum (Arborea), Panama e Pyrogenes.

Os resultados obtidos mostraram que a Leptospirose está presente entre os doentes febris na província da Huíla, sendo importante incluir esta zoonose no diagnóstico diferencial e promover medidas de prevenção e controlo, especialmente nos grupos de risco agora identificados.

**Palavras-chave:** Leptospirose, Ocorrência, TAM, PCR, Lubango-Angola

## ABSTRACT

---

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. It occurs mainly in developing countries in tropical and subtropical regions. In recent years it has become an emerging public health problem, affecting a wide variety of mammals (hosts), including humans. Presently, there is an increasing number of cases with different epidemiological pattern, as well as the reemergence of outbreaks due to climate changes. However, due to the nonspecific symptoms the clinical diagnosis is confused with other pathologies and the laboratory support is difficult and expensive, requiring resources and technical expertise.

In Angola (Lubango), the laboratory diagnosis is not performed due to the unavailability of specific tests, which results in the lack of disease prevalence knowledge. Thus, in order to determine the serological and molecular of human leptospirosis occurrence was in febrile patients attended at the Central Hospital of Lubango, contributing for: *i*) to include this pathology at the differential diagnosis of patients with undetermined febrile syndromes; and *ii*) to implement measures for prevention and control of epidemiological risk factors.

We analyzed 300 serum samples obtained from an equivalent number of patients who were assisted at the hospital, from September to December 2012, and a clinical and epidemiological questionnaire was applied. Serological evaluation was performed, using a screening technique (MACROLepto) and the reference technique (Microscopic Agglutination Technique; MAT). Molecular analysis was done by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the primers based on *hapI* gene (for pathogenic leptospires). The amplified products were sequenced in order to determine the *Leptospira* genospecies.

The sampling population consisted of male (111; 37%) and (189; 63%) female individuals. The clinical suspicion of leptospirosis was confirmed serologically by MAT in (120<sup>+</sup>/300; 40%) of patients, and PCR analysis was positive in (30<sup>+</sup>/193; 16%) of the samples. DNA sequencing allowed identify three genospecies: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* and *L. kirschneri*.

The participants in the study were distributed by age groups, with a mean age of 30 years. The groups (11-20 e 21-30 years) was the most represented and the female gender the most affected. Fever (91%), headache (84%) and myalgia (59%), were the main clinical manifestations reported.

Regarding to the variables for *Leptospira* infection, it was found that the lack of sanitation, exposure to waste, presence of rodents nearby populations and consumption of untreated water, were the situations more mentioned. Contact with rodents followed by canine was reported by 97% and 41%, of the positive patients. Regarding to the patient's origin, the majority of them came from suburban areas.

In terms of occupation, the highlights were the peasant women, students and the household.

Serum samples with positive results showed specific reactivity against leptospire of 19 serogroups (serovars) namely, Icterohaemorrhagiae (Copenhageni), Hebdomadis, Javanica (Poi), Australis (Bratislava) and Sejroe (Hardjobovis). The highest titer of 1:800 was observed for Copenhageni, Ballum (Arborea) Panama and Pyrogenes serovars.

These results showed that Leptospirosis is present among febrile patients in Huila province and it is important now, to include this zoonosis in the differential diagnosis and promote the prevention and control measures, especially for identified risk groups.

**Keywords:** Leptospirosis, Ocurrence, MAT, PCR, Lubango-Angola

# ÍNDICE GERAL

---

|  | Pág.         |
|--|--------------|
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>   | <b>iii</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>vii</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>ix</b>    |
| <b>ÍNDICE GERAL.....</b>   | <b>xi</b>    |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>   | <b>xvii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>  | <b>xxi</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS.....</b>                         | <b>xxiii</b> |
| <br>   |              |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>     |
| 1.1. Justificação do tema.....   | 1            |
| 1.2. Objectivos.....   | 3            |
| 1.3. Revisão da Literatura.....  | 3            |
| 1.3.1. Aspectos históricos.....  | 3            |
| 1.3.2. Classificação de <i>Leptospira</i> spp.....                             | 5            |
| 1.3.3. Biologia e morfologia de espiroquetas do género <i>Leptospira</i> ..... | 6            |
| 1.3.4. Meios de Cultura .....  | 8            |
| 1.4. Epidemiologia.....  | 9            |
| 1.4.1. Leptospiras e o ambiente.....   | 9            |
| 1.4.2. Leptospirose humana.....  | 12           |
| 1.4.3. Ocorrência e distribuição Mundial.....                                  | 13           |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 1.4.4.    | Importância actual da Leptospirose.....                          | 15        |
| 1.5.      | Aspectos clínicos.....   | 16        |
| 1.5.1.    | Diagnóstico.....   | 18        |
| 1.5.2.    | Diagnóstico laboratorial.....                                    | 18        |
| 1.5.3.    | Métodos Directos .....   | 19        |
|           | Microscópia de fundo escuro.....                                 | 19        |
|           | Isolamento Bacteriano (Cultura) .....                            | 20        |
|           | Amplificação do DNA (PCR) .....                                  | 20        |
| 1.5.4.    | Métodos Indirectos.....  | 21        |
|           | Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACRO).....                 | 21        |
|           | Testes Rápidos (Dipstick tests) / <i>Leptospira</i> spp.....     | 22        |
|           | Técnica ELISA ( <i>Enzime-linked immunosorbent assay</i> ) ..... | 22        |
|           | Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) .....                  | 23        |
| 1.6.      | Tratamento, medidas de prevenção e controlo.....                 | 25        |
| 1.6.1.    | Terapêutica.....   | 25        |
| 1.6.2.    | Medidas de prevenção e controlo.....                             | 26        |
| <b>2.</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>29</b> |
| 2.1.      | População alvo e selecção da amostra.....                        | 29        |
| 2.1.1.    | Local do estudo.....   | 29        |
| 2.1.2.    | Amostragem e critérios de inclusão.....                          | 30        |
| 2.1.3.    | Recolha de amostras e dados clínicos- epidemiológicos.....       | 31        |
|           | Obtenção de amostras séricas .....                               | 33        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| Testes e procedimentos Laboratoriais.....   | 33        |
| 2.2. Testes Serológicos.....  | 34        |
| 2.2.1. Teste de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto) .....                             | 34        |
| 2.2.2. Teste rápido (SD Bioline <i>Leptospira</i> IgM/ IgG) .....                       | 35        |
| 2.2.3. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) .....                                  | 36        |
| 2.3. Testes Moleculares.....  | 38        |
| 2.3.1. Extração de DNA em amostras de soro.....   | 38        |
| 2.3.2. Amplificação de DNA (PCR).....   | 38        |
| 2.3.3. Visualização dos produtos amplificado (DNA) de <i>Leptospira</i> spp..           | 41        |
| 2.3.4. Sequenciação do produto amplificado (DNA).....                                   | 42        |
| 2.4. Análise e tratamento de dados.....   | 42        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1. População alvo.....  | 45        |
| 3.1.1. Caracterização da população estudada (amostras) .....                            | 45        |
| 3.1.2. Aspectos epidemiológicos quanto ao tipo de risco de exposição à<br>infecção..... | 46        |
| Área de proveniência/residência.....  | 46        |
| Ocupação profissional.....  | 47        |
| Contacto com roedores e/ou potenciais hospedeiros.....                                  | 47        |
| Contacto/consumo de água não tratada, viagens e outras<br>situações.....                | 49        |
| Condições ambientais de saneamento básico nas áreas residenciais<br>dos doentes.....    | 49        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.3.    | Manifestações Clínicas (sinais e sintomas).....  | 51        |
| 3.2.      | Testes Serológicos.....  | 53        |
| 3.2.1.    | Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre a lâmina (MACRO Lepto).....                                  | 53        |
| 3.2.2.    | Kit (SD Bioline <i>Leptospira</i> IgM/ IgG).....   | 53        |
| 3.2.3.    | Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM).....   | 53        |
|           | Avaliação dos resultados obtidos pelas duas técnicas serológicas (MACROLepto e TAM).....               | 55        |
| 3.3.      | Testes moleculares.....  | 60        |
| 3.3.1.    | Testes especificidade e sensibilidade dos <i>Primers</i> hap1.....                                     | 60        |
| 3.3.2.    | Amplificação de DNA de soros por PCR com os <i>primers</i> hap1.....                                   | 61        |
|           | Análise comparativa dos resultados da PCR <i>versus</i> métodos serológicos.....                       | 62        |
| 3.3.3.    | Sequenciação de produtos amplificados (DNA).....   | 64        |
| 3.4.      | Tratamento estatístico.....  | 65        |
|           | Dados epidemiológicos e risco de exposição à infecção por <i>Leptospira</i> spp.....                   | 65        |
|           | Análise estatística dos dados epidemiológicos quanto às manifestações clínicas e outras situações..... | 66        |
|           | Avaliação de concordância entre técnicas (MACROLepto e TAM)...   | 66        |
| <b>4.</b> | <b>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>5.</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | <b>81</b> |
| 5.1       | <b>NOVIDADE CIENTIFICA</b> .....   | <b>82</b> |
| 5.2       | <b>PERPECTIVAS FUTURAS</b> .....   | <b>83</b> |

---

|                    |   |            |
|--------------------|---|------------|
| <b>6.</b>          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                          | <b>85</b>  |
|                    | <b>ANEXOS.....</b>  | <b>101</b> |
| <b>ANEXO I.</b>    | Parecer da aprovação do Conselho de Ética do IHMT/UNL.....      | 101        |
| <b>ANEXO I a.</b>  | Parecer da aprovação do Comité de Ética de saúde de Angola..... | 103        |
| <b>ANEXO II.</b>   | Informação ao doente/utente sobre a Leptospirose.....           | 105        |
| <b>ANEXO IIa.</b>  | Declaração de consentimento informado.....                      | 107        |
| <b>ANEXO III.</b>  | Fichas de Inquérito clínico epidemiológico.....                 | 109        |
| <b>ANEXO IV.</b>   | Procedimento da MACROLepto.....                                 | 113        |
| <b>ANEXO V.</b>    | Procedimento da TAM (Técnica de Aglutinação Microscópica) ...   | 115        |
| <b>ANEXO VI.</b>   | Protocolo de Extração e purificação de DNA (Kit Citogene®)..... | 123        |
| <b>ANEXO VII.</b>  | Resultados POS nas técnicas (MACRO e TAM) (n=34 amostras).      | 127        |
| <b>ANEXO VIII.</b> | Representação de alguns resultados de sequenciação.....         | 129        |



## Índice de Figuras

---

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura 1.1.</b> Microfotografia electrónica de <i>Leptospira</i> .....   | 6           |
| <b>Figura 1.2.</b> Esquematização morfológica, de <i>Leptospira</i> , em corte transversal.....   | 7           |
| <b>Figura 1.3.</b> Cultura em meio semi-sólido (formação do anel de Dinger) .....   | 9           |
| <b>Figura 1.4.</b> Ciclo de transmissão de leptospiras patogénicas<br>reservatórios/hospedeiros acidentais .....                                      | 11          |
| <b>Figura 1.5.</b> Distribuição mundial de Leptospirose humana.....   | 14          |
| <b>Figura 1.6.</b> Visualização de <i>Leptospira</i> spp. em microscopia de fundo escuro<br>fotografia x 200 .....                                    | 19          |
| <b>Figura 2.1. A</b> Imagem da cidade do Lubango tirada em resolução maior.....   | 29          |
| <b>Figura 2.1. B</b> Mapa da província da Huíla com destaque para a região do Lubango...  | 29          |
| <b>Figura 2.2.</b> Representação gráfica da distribuição dos doentes (N=300) por<br>género.....   | 30          |
| <b>Figura 2.3. A</b> Assinatura da Declaração de consentimento.....   | 32          |
| <b>Figura 2.3. B</b> Colheita de sangue a doente internada nos serviços de Medicina do HC<br>(Setembro 2012) .....                                    | 32          |
| <b>Figura 2.4.</b> Representação esquemática do teste serológico de rastreio da<br>Leptospirose: Técnica Aglutinação Macroscópica sobre a lâmina..... | 34          |
| <b>Figura 2.5.</b> Imagem do teste Dipstick Lepto (SD bioline <i>Leptospira</i> IgM/<br>IgG.....  | 36          |
| <b>Figura 2.6.</b> Observação no microscópio de fundo escuro das placas utilizadas na<br>TAM com os soros dos doentes estudados .....                 | 36          |
| <b>Figura 2.7.</b> Execução da PCR no termociclador utilizado para amplificação de<br>DNA leptospírico.....   | 40          |

|                      |  |    |
|----------------------|--|----|
| <b>Figura 3.1. A</b> | Representação gráfica da distribuição da população estudada [(doentes); N=300] por faixa etária.....   | 45 |
| <b>Figura 3.1.B</b>  | Representação gráfica da distribuição de doentes (N=300) segundo a faixa etária <i>versus</i> género.....  | 46 |
| <b>Figura 3.2.</b>   | Representação gráfica da distribuição de doentes (%), segundo a proveniência/ residência.....  | 47 |
| <b>Figura 3.3.</b>   | Imagem sobre os destinos residuais.....  | 50 |
| <b>Figura 3.4.</b>   | Representação gráfica da distribuição de doentes inquiridos de acordo com as principais manifestações clínicas (sinais e sintomas) .....                   | 51 |
| <b>Figura 3.5.</b>   | Representação gráfica da distribuição de doentes <i>versus</i> diagnóstico clínico.....  | 52 |
| <b>Figura 3.6.</b>   | Representação gráfica da distribuição de doentes de acordo com outras situações clínicas.....  | 52 |
| <b>Figura 3.7.</b>   | Distribuição dos resultados obtidos pela TAM no total de amostras (N=300).....   | 54 |
| <b>Figura 3.8.</b>   | Representação esquemática dos resultados positivos pela MACROLepto e confirmados pela TAM.....   | 56 |
| <b>Figura 3.9.</b>   | Distribuição dos resultados positivos e não conclusivos confirmados pela TAM e respectivos serogrupos (serovares).....                                     | 56 |
| <b>Figura 3.10.</b>  | Resultado do teste de especificidade com <i>primers</i> hap1 (262 pb) de Serogrupos de <i>L. interrogans</i> .....   | 60 |
| <b>Figura 3.11.</b>  | Resultado do teste de sensibilidade do PCR com o <i>primers</i> hap1 (262pb) em diluições seriadas de culturas de serogrupo Icterohaemorrhagiae (RGA)..... | 61 |
| <b>Figura 3.12.</b>  | Resultados de algumas amostras de soro (dos doentes) amplificadas pela PCR com <i>primers</i> hap1 .....   | 62 |
| <b>Figura 3.13.</b>  | Representação gráfica dos resultados obtidos pelas três técnicas realizadas (MACROLepto, TAM, PCR) .....   | 63 |
| <b>Figura 3.14.</b>  | Representação gráfica das amostras com o resultado positivo pelas três técnicas utilizadas (MACROLepto, TAM e PCR).....                                    | 63 |
| <b>Figura 3.15.</b>  | Representação gráfica de amostras com resultado negativo pela PCR e positivo pela TAM.....   | 64 |

## ÍNDICE DE TABELAS

---

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Tabela 1.1.</b> | Reservatórios dos principais serovares do género <i>Leptospira</i> spp. a nível mundial.....  | 12 |
| <b>Tabela 1.2.</b> | Bateria de referência de serovares de <i>Leptospira</i> spp. recomendada para o diagnóstico imunológico de Leptospirose (TAM) .....                           | 24 |
| <b>Tabela 2.1.</b> | Distribuição de amostras de acordo com as técnicas realizadas <i>versus</i> dias de evolução da doença.....   | 34 |
| <b>Tabela 2.2.</b> | <i>Primers</i> hap1 usado na amplificação do DNA.....   | 38 |
| <b>Tabela 2.3.</b> | Descrição dos componentes usados na mix. para a PCR .....   | 40 |
| <b>Tabela 2.4.</b> | Descrição das condições de amplificação do DNA leptospírico.....  | 41 |
| <b>Tabela 3.1.</b> | Distribuição da população em estudo (N=300) por profissão/ocupação.....   | 48 |
| <b>Tabela 3.2.</b> | Distribuição de doentes em relação ao contacto com roedores e/ou potenciais hospedeiros/ reservatórios.....   | 48 |
| <b>Tabela.3.3.</b> | Distribuição de doentes de acordo com as variáveis ‘ contacto / consumo de água não tratada’, ‘ viagens’ e ‘outras situações’ .....                           | 49 |
| <b>Tabela 3.4.</b> | Distribuição dos doentes estudados de acordo com as ‘condições ambientais’ e de ‘saneamento básico’ nas áreas residenciais.....                               | 50 |
| <b>Tabela 3.5.</b> | Distribuição de serogrupos reactivos na TAM <i>versus</i> títulos obtidos.....  | 55 |
| <b>Tabela 3.6.</b> | Distribuição dos resultados obtidos pelas técnicas MACRO e TAM.....   | 55 |
| <b>Tabela 3.7.</b> | Caracterização das 34 amostras POS paralelamente positiva na MACRO e TAM <i>versus</i> dados epidemiológicos.....   | 58 |
| <b>Tabela 3.8.</b> | Caracterização de soros com resultados confirmados pela TAM em relação aos principais sinais e sintomas, diagnóstico clínico e outras situações clínicas..... | 59 |
| <b>Tabela 3.9.</b> | Distribuição das amostras analisadas por PCR (fase aguda de evolução da doença e NEG na TAM) utilizando os <i>primers</i> hap1.....                           | 62 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 3.10.</b> Principais associações entre as variáveis epidemiológicas e o risco de Leptospirose na população estudada, face aos resultados obtidos por TAM e PCR..... | 65 |
| <b>Tabela 3.11.</b> Principais associações entre as manifestações clínicas e o risco de Leptospirose na população estudada, face aos resultados obtidos por TAM e PCR.....    | 66 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>AAS</b>      | Ácido Acetilsalicílico   |
| <b>BLAST</b>    | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                               |
| <b>BSA</b>      | Bovine serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)                         |
| <b>C.ex</b>     | Controlo de extracção de DNA   |
| <b>CN</b>       | Controlo Negativo  |
| <b>C+</b>       | Controlo Positivo  |
| <b>DNA</b>      | <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)              |
| <b>Dr.A.A.</b>  | Doutor António Agostinho   |
| <b>dNTP</b>     | Desoxirribonucleótido-trifosfato                                       |
| <b>EDTA</b>     | Ácido Etilenodiaminotetracético  |
| <b>ELISA</b>    | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                               |
| <b>EMJH</b>     | <i>Ellinghausen, McCullough Johnson &amp; Harris</i>                   |
| <i>et al</i>    | e colaboradores  |
| <b>ex:</b>      | Exemplo  |
| <b>Fig.</b>     | Figura   |
| <b>gr</b>       | Gramma   |
| <b>hap1</b>     | hemolysis-associated <i>proteína1</i> (proteína associada à hemólise)  |
| <b>HC</b>       | Hospital Central   |
| <b>IgG</b>      | Imunoglobulina do tipo G   |
| <b>IgM</b>      | Imunoglobulina do tipo M   |
| <b>Ie</b>       | Incidências dos expostos   |
| <b>Ine</b>      | Incidências dos não expostos   |
| <b>IHMT/UNL</b> | Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa |

|   |  |
|---|--|
| <b>K</b>  | Kappa (medida do grau de concordância)                             |
| <b>Kb</b>   | Kilobase   |
| <b>Km<sup>2</sup></b>                             | Quilómetro quadrado  |
| <b><i>L.i</i></b>                                 | <i>Leptospira inadai</i>   |
| <b>L&amp;BL</b>                                   | Laboratório de Leptospirose & Borreliose de Lyme                   |
| <b>LPS</b>  | Lipolissacáridos   |
| <b>M</b>  | Marcadores de base   |
| <b>MACRO</b>                                      | Técnica de Aglutinação Macroscópica                                |
| <b>Mix</b>  | Mistura  |
| <b>ml</b>   | Mililitro  |
| <b>mg</b>   | Miligrama  |
| <b>mM</b>   | Milimolar  |
| <b>n/N</b>  | Número de frequência   |
| <b>NI</b>   | Não Indicado   |
| <b>NaCl</b>                                       | Cloreto de Sódio   |
| <b>NC</b>   | Não Conclusivo   |
| <b>NEG</b>  | Negativo   |
| <b>NH<sub>4</sub></b>                             | Amónia   |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | Sulfato de Amónia  |
| <b>nM</b>   | Nanomolar  |
| <b>OMS</b>  | Organização Mundial de Saúde                                       |
| <b>pb</b>   | Pares de Bases   |
| <b>PBS</b>  | Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)                  |
| <b>PCR</b>  | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacção em Cadeia de Polimerase) |
| <b>P</b>  | (p-value) (Nível de Significância)                                 |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>POS</b>           | Positivo   |
| <b>rpm</b>           | Rotações por minuto  |
| <b>rRNA</b>          | ribosomal <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico ribossomal)      |
| <b>RR</b>            | Risco Relativo   |
| <b>seg</b>           | Segundo  |
| <b>s.l.</b>          | sensu lato   |
| <b>spp.</b>          | Espécies   |
| <b>Taq</b>           | <i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase (enzima termo aquática)        |
| <b>TAE</b>           | Tampão Tris, Ácido Acético   |
| <b>TAM</b>           | Teste de Aglutinação Microscópica                                      |
| <b>tris-HCl</b>      | tris (hidroximetilo) aminometano – ácido clorídrico                    |
| <b>µg</b>            | Micrograma   |
| <b>µl</b>            | Microlitro   |
| <b>µm</b>            | Micrómetro   |
| <b>mg</b>            | Miligrama  |
| <b>µM</b>            | Micromolar   |
| <b>GLBL</b>          | Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme                             |
| <b>UEIMM</b>         | Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica               |
| <b>U</b>             | Unidade  |
| <b>UV</b>            | Ultravioleta   |
| <b>vs</b>            | <i>versus</i>  |
| <b>χ<sup>2</sup></b> | Qui-quadrado   |
| <b>WHO/ILS</b>       | <i>World Health Organization / International Leptospirosis Society</i> |
| <b>%</b>             | Porcentagem  |
| <b>°C</b>            | Grau Celsius   |



# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Justificação do Tema

A Leptospirose é uma doença infecciosa, considerada (re)emergente e (re)descoberta, com importância zoonótica mundial. É causada por bactérias patogénicas do género *Leptospira* <sup>(47,57,78)</sup>. É ainda considerada uma doença endémica em muitas regiões, cuja distribuição está associada a factores ambientais e algumas actividades ocupacionais. A maior ocorrência da doença é nas épocas de elevada precipitação pluviométrica <sup>(48,65,79,84,101)</sup>.

Na generalidade mais de 90% das manifestações clínicas são pouco graves e moderadas, no entanto, existem formas mais graves cuja frequência de observação tem aumentado nos últimos anos <sup>(47,58,85)</sup>. A diversidade inespecífica dos sintomas pode dificultar o diagnóstico clínico definitivo, sendo muitas vezes necessário a utilização de testes laboratoriais <sup>(5,45)</sup>.

Os roedores, são reservatórios por excelência de *Leptospira* spp. <sup>(57)</sup>. Alguns animais domésticos e de produção pecuária, em particular canídeos, bovinos, caprinos e suínos, são susceptíveis e podem tornar-se portadores crónicos após uma infecção <sup>(80,82,99)</sup>. Os reservatórios animais eliminam as bactérias pela urina e contaminam o ambiente (o solo, a água e o habitat envolvente). Os animais, incluindo os humanos são infectados por contacto directo com a urina de ratos e outros animais portadores de leptospirosas ou por contacto indirecto, com o ambiente contaminado <sup>(38, 58)</sup>.

Nas regiões de clima temperado e/ou tropical em que as condições climáticas são favoráveis (temperatura moderada e acentuada humidade relativa), o saneamento básico é deficitário, e há presença de roedores próximo das populações, assiste-se muitas vezes nos centros urbanos a um crescimento populacional desordenado e uma produção de lixo sem o devido tratamento, o que proporciona condições favoráveis para a proliferação de roedores (principais reservatórios) como referido pela WHO (World Health Organization) e a própria International Leptospirosis Society (ILS). Estes factores favorecem em tudo a presença e a manutenção das leptospirosas no ambiente <sup>(4,38,44,58,59,79,84)</sup>.

Em África, a ausência do conhecimento sobre a prevalência e a incidência da Leptospirose deve-se, por um lado às dificuldades inerentes ao seu diagnóstico, e por outro, a Leptospirose, não tem sido definida como uma preocupação prioritária de Saúde Pública ou incluída em programas nacionais de prevenção de doenças<sup>(48,51, 62, 88, 89)</sup>, embora mundialmente seja considerada uma doença de declaração obrigatória<sup>(100)</sup>.

Angola é um país de clima tropical e ainda não existem estudos publicados sobre a Leptospirose humana e só recentemente se iniciaram os primeiros estudos a nível clínico e epidemiológico, no âmbito de mestrados e doutoramentos, em algumas províncias tais como Benguela, Huambo e Luanda.

A província da Huíla (Lubango), sendo uma região com clima favorável, saneamento básico e abastecimento de água pouco eficientes, reúne todas as condições para a existência e reprodução de roedores, pelo que se admite que a população da referida província esteja bastante exposta a estas bactérias presentes no ambiente envolvente. Esta constatação foi a principal motivação para a realização da presente investigação, concretamente no Hospital Central Dr. António Agostinho Neto. Este hospital é a maior Instituição de Saúde da região sul do país acolhendo quase toda a população daquela área, e até ao presente, a Leptospirose não está incluída no diagnóstico diferencial dos doentes/utentes que ocorrem ao referido Hospital. Sabe-se que esta doença é caracterizada pela presença de febre, entre outros sinais e sintomas inespecíficos o que a torna facilmente confundível com outras doenças, tais como a Malária. No entanto, estas doenças cujos diagnósticos nem sempre se confirmam, persistem nos doentes com uma síndrome febril de origem indeterminada. Assim, torna-se pertinente perceber se a mesma pode ser uma consequência da infecção por *Leptospira* spp.

Com este trabalho, admite-se poder dar um contributo, por pequeno que seja, a esta causa e, por conseguinte, informar sobre os resultados do estudo as Autoridades de Saúde, locais e nacionais, na certeza de que se poderá melhorar o diagnóstico e tratamento de potenciais doentes, acometidos por esta doença. Ao mesmo tempo, ajudará na implementação de medidas de saneamento básico que possam contribuir para a prevenção da doença, permitindo agilizar o conhecimento de situações análogas noutras localidades.

## 1.2. Objectivos

O objectivo geral deste trabalho foi assim, determinar a sero-ocorrência da Leptospirose humana através de um rastreio numa amostra populacional, constituída pelos doentes/utentes assistidos no Hospital Central Dr. A. A. Neto (Lubango), com queixas compatíveis com Leptospirose, nomeadamente apresentando febre.

### ❖ Objectivos específicos

1 - Aplicar um inquérito clínico-epidemiológico, a fim de determinar a existência ou não de factores de risco para a ocorrência de infecção humana por *Leptospira* spp.;

2 - Avaliar a presença de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* (s.l.) e/ou DNA leptospírico em soros humanos, através da aplicação de técnicas serológicas e moleculares, respectivamente;

3 - Avaliar os factores predisponentes para a ocorrência da infecção por *Leptospira* spp. nas áreas de residência dos doentes, através da avaliação de dados clínico-epidemiológicos recolhidos nos inquéritos;

4 – Determinar e identificar os serovares patogénicos de *Leptospira* prevalentes na região, para uma futura inclusão da Leptospirose no diagnóstico diferencial de doentes que apresentam síndrome febril indeterminada.

## 1.3. Revisão da Literatura

### 1.3.1. Aspectos históricos

Diversas epidemias com características de uma síndrome infecciosa e icterica, com disfunções renais e hepáticas, foram observadas e descritas até ao final do séc. XIX, contudo as causas eram desconhecidas <sup>(50)</sup>. Até então esta síndrome foi descrita e conhecida como síndrome de Weil ou Leptospirose, a forma mais grave da Leptospirose humana. Esta denominação foi em homenagem a Adolf Weil, médico alemão, que fez pela primeira vez a descrição da doença num paciente com icterícia em 1886 em Heidelberg <sup>(50,99,102)</sup>. Esta síndrome era semelhante a uma outra que já tinha sido

descrita, no Cairo, (Larrey, 1880) e em Paris (Landauzy, 1883) pouco tempo antes, em trabalhadores de limpeza de esgotos <sup>(38,57,58,59)</sup>.

No entanto, o agente responsável pela Leptospirose foi demonstrado e descrito, uns anos mais tarde, por Stimson em 1907. Este investigador, ao observar os túbulos renais de um doente que tinha morrido com icterícia, recorreu a uma coloração de prata (método de impregnação argêntica) e notou um aglomerado de microrganismos espiralados, com extremidades em forma de gancho, que por se assemelharem a um ponto de interrogação lhes atribuiu a designação de *Spirochaeta interrogans* <sup>(50,57,99)</sup>. Infelizmente, esta observação sentinela foi esquecida durante alguns anos <sup>(58)</sup> uma vez que a observação foi feita num doente que tinha como causa da morte a febre-amarela, e não a doença de Weil. Todavia, Stimson criou as bases de nomenclatura do agente etiológico da Leptospirose <sup>(50,99)</sup>.

Porém, só em 1914-1915, é que a etiologia da Leptospirose foi confirmada no Japão e na Alemanha. Dois médicos japoneses, Inada e Ido, demonstraram o modo de infecção por espiroquetas, a partir de uma inoculação em cobaias, de sangue de um doente que tinha síndrome de Weil, tendo então detectado espiroquetas, que designaram por *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica* <sup>(27,28,99)</sup>. Quase em simultâneo, duas equipas de investigadores germânicos, Huebener & Reiter (1915) e Uhlenhuth & Formme (1916), também estudaram amostras de sangue de soldados alemães, que padeciam da chamada “doença francesa das trincheiras”. Estas amostras de sangue foram inoculadas também em cobaias, tendo sido detectadas espiroquetas que foram designadas por *Spirochaeta nodosa* e *Spirochaeta icterogenes* <sup>(27,44,50,99)</sup>.

Posteriormente, Noguchi (1917) estabeleceu a designação do género *Leptospira*, do grego, *lepto* que significa delgado, fino, e *spiras* que significa novelo espiral <sup>(92)</sup>.

Em 1917, a referida equipa japonesa (Inada e Ido), descreveu também o papel dos roedores como fonte de infecção humana, e como reservatórios silváticos de manutenção de leptospiras, o que permitiu um melhor conhecimento e compreensão dos fundamentos epidemiológicos (fonte de infecção, modo de transmissão e hospedeiros susceptíveis) <sup>(33,44,57,58,99)</sup>.

Desde então, sabe-se que os roedores, especialmente os do género *Rattus*, como por exemplo, a ratazana (*Rattus norvegicus*), são os principais reservatórios do agente causal da doença de weil ou Leptospirose ictérica sendo possível detectar focos de infecção em quase todo mundo, excepto na Antárctida de acordo com Little e colaboradores (1986) citado por Vieira, 2006.

Ao longo da história, outros sinónimos além de “Doença de Weil”, têm sido atribuídos à Leptospirose, como por exemplo: “Febre dos pântanos” (Brasil), “Icterícia dos apanhadores de arroz” (China); “Febre outonal” (Japão); “Doenças dos tratadores de porcos” (Europa); “Gripe de trabalhadores de esgotos” (E.U.A e França) ou “Doença dos ratos” no Arquipélago dos Açores, entre outras designações<sup>(4,31,37,44,71)</sup>. Por outro lado a Leptospirose em animais domésticos e de produção pecuária foi reconhecida entre 1852-1958, segundo Hoefler e colaboradores, designaram a doença de “Tyfus Febris Nervosa Canum” ocorrida em cães; por sua vez em 1935 Michin & Avinov na ex-união Soviética identificaram a infecção por leptospiras nos bovinos designando-a como “hemoglobinúria infecciosa aguda” citado por Vieira 2006<sup>(99)</sup>.

No continente Africano os primeiros diagnósticos de Leptospirose animal são reportados nos meados do século XX, na Argélia por Donatien & Gayot, em 1950, em Tunes por Cordier em 1952, e na Somália por Farina e Sobreiro 1960 como referido por Vieira 2006<sup>(99)</sup>.

### **1.3.2. Classificação de *Leptospira* spp.**

A classificação taxonómica das leptospiras é complexa e tem sido controversa entre autores<sup>(38,58,65,80)</sup>, sendo a mesma baseada em dois sistemas: convencional (antigénico) e molecular. Segundo o sistema convencional, alguns autores consideram que o género *Leptospira* está dividido em dois grupos: leptospiras patogénicas da espécie *L. interrogans* sensu lato (s.l.) e saprófitas da espécie *L. biflexa* (s.l.)<sup>(57,58)</sup>. Para outros autores, o género *Leptospira* é constituído por três grupos (patogénicas, saprófitas e intermédias)<sup>(5,80)</sup>. No entanto, todos se baseiam em agrupamentos, designados serogrupos, de acordo com as afinidades antigénicas existentes entre elas<sup>(2,38,39,58,65)</sup>.

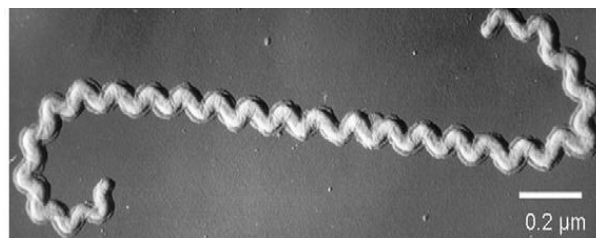
A espécie com maior interesse zoonótico é *L. interrogans* (s.l.) que inclui mais de 230 serovares (unidade taxonómica básica) e compreende todas as estirpes patogénicas,

reunidas em cerca de 23 serogrupos. A espécie *L. biflexa* (s.l.) agrupa as estirpes saprófitas, isoladas no ambiente, estando descritos mais de 60 serovares, reunidos em 38 serogrupos <sup>(35,38,50,58)</sup>. Cada serovar possui hospedeiros preferenciais, ainda que uma espécie animal possa “alojar” um ou mais serovares <sup>(5,79)</sup>.

A classificação molecular obtida por genotipagem tem vindo a ser descrita, e divide o género *Leptospira* em diversas espécies patogénicas, não patogénicas e também espécies intermédias. Esta classificação foi baseada em espécies genómicas que apresentam um grau de homologia em hibridação DNA-DNA de 70% e menor de 5% de divergência <sup>(44,58)</sup>. Entretanto, a classificação molecular (genotípica) nem sempre é concordante com a classificação antigénica (fenotípica), uma vez que existem serovares/estirpes pertencentes ao mesmo serogrupo que pertencem a espécies genómicas diferentes <sup>(45,53,58,87,92)</sup>. Por sua vez, as espécies intermédias incluem serogrupos com características comuns tanto às leptospiros patogénicas como às saprófitas, de acordo com as suas características genéticas e com base na sequenciação do gene 16S rRNA, sendo que a sua virulência não foi demonstrada experimentalmente <sup>(45,56,80)</sup>.

### 1.3.3. Biologia e morfologia de espiroquetas do género *Leptospira*

As bactérias do género *Leptospira* são espiroquetas móveis, com espiras finas e regulares, movimento ondulado e com extremidades encurvadas em gancho, características que lhes asseguram uma elevada capacidade invasiva. Têm um comprimento de 6-20 µm e um diâmetro de 0,1-0,15 µm, pelo que são apenas visíveis em microscopia de fundo escuro <sup>(38)</sup>, (**Fig. 1.1**).

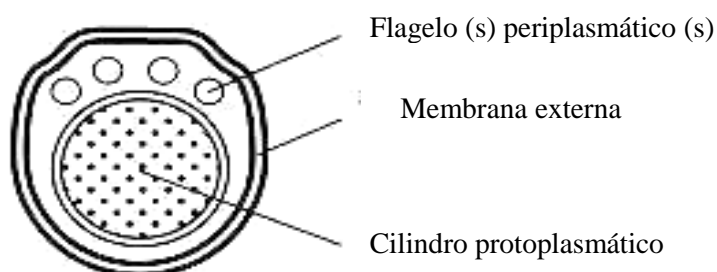


**Figura 1.1** Microfotografia electrónica de *Leptospira*

(Adaptado de Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

In: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>

As leptospiras possuem dois filamentos axiais [flagelo (s) periplasmático (s)] com inserção polar, que estão localizados no espaço periplasmático (**Fig. 1.2**)<sup>(38,58)</sup>. Apresentam membrana dupla, típica e comum a outras espiroquetas, a membrana citoplasmática e a parede celular (peptoglicano) estão associadas, e ainda uma membrana externa<sup>(21,27)</sup>. Esta última é constituída por proteínas, lípidos e lipolissacáridos (LPS). Os LPS têm grande importância antigênica, com uma composição semelhante a outras bactérias Gram negativas embora com menor actividade endotóxica<sup>(16,56,58)</sup>.



**Figura 1.2.** Esquemática morfológica, de *Leptospira*, em corte transversal

(Adaptado de [http:// www.nbi.clm.gov/books/NBK8445/](http://www.nbi.clm.gov/books/NBK8445/))

As espécies do género *Leptospira* são caracterizadas por uma motilidade única, com rápidas rotações, mantendo sempre as extremidades encurvadas, possibilitando que a parte central fique quase fixa originando uma forma em oito [em forma de saca rolha (spin)] muito característico<sup>(27,31)</sup>.

Estas bactérias são morfológicamente muito semelhantes, mas em cultura, alguns isolados têm diferenças quanto ao tempo de crescimento, podendo umas aparecerem em forma de pequenos grânulos e outras muito compridas<sup>(68,86,99)</sup>. Os antígenos de superfície das diferentes espécies de *Leptospira*, depois de várias subculturas, podem perder alguma capacidade infectante (virulência), sendo recuperada quando se faz passar a cultura por um modelo animal (ex: hamster)<sup>(21,58,71,76)</sup>.

As bactérias do género *Leptospira* são aeróbias obrigatórias, crescem em meio com pH entre 6,8-7,4, a uma temperatura de 28-30°C, ao abrigo da luz e de preferência sob

agitação orbital <sup>(27,38)</sup>. Têm ainda como fonte de energia os ácidos gordos de cadeia longa <sup>(99)</sup>.

Quando no ambiente, as condições ótimas de sobrevivência são: humidade elevada, temperatura amena, pH neutro ou ligeiramente alcalino e baixo grau de poluição dos solos e/ou de águas <sup>(28)</sup>. Em condições desfavoráveis tais como sob a luz solar ou hipersalinidade (água do mar), sobrevivem apenas por algumas horas (18-24h), bem como quando sujeitas a desinfetantes (ex: lixívia), detergentes comuns (sabão) e temperaturas acima de 50°C <sup>(28,32)</sup>. O período de sobrevivência varia de estirpe para estirpe, nas condições ótimas referidas, sendo que umas se podem multiplicar e persistir mais tempo do que outras <sup>(17)</sup>. Registos de dados experimentais confirmam a viabilidade de alguns serovares (*Pomona* e *Icterohaemorrhagiae*) de 100 até 180 dias <sup>(19,34,92)</sup>.

Do ponto de vista molecular, o género *Leptospira*, apresenta um genoma constituído por dois cromossomas circulares, com cerca de 4700 genes, com 4400 kb, e outro mais pequeno com cerca de 350 kb <sup>(58)</sup>. O referido genoma é o maior quando comparado com o de outras espiroquetas, como as do género *Treponema* e *Borrelia*, o que indica a capacidade de adaptação das leptospiras a viverem em diferentes ambientes, de forma livre ou parasitando vários animais (reservatórios/hospedeiros) <sup>(26,42,90)</sup>. Assim, é importante o conhecimento molecular das espécies de *Leptospira*, pois não basta só a denominação de uma espécie bacteriana, mas também é necessário situá-la do ponto de vista ecológico <sup>(2,53,58,92)</sup>.

#### **1.3.4. Meios de cultura**

As leptospiras sendo microrganismos muito sensíveis, exigem meios de culturas especiais <sup>(5)</sup>. O seu crescimento é muito variável, podendo crescer em meios isentos de proteínas ou enriquecidos. Meios artificiais (líquidos e semi-sólidos) têm sido descritos, ao longo do tempo, destacando-se os meios de Fletcher (1928), Korthof (1932) e Stuart (1946) <sup>(16,27,38,58)</sup>. Actualmente, o meio mais usado na rotina de laboratório é o EMJH (Ellinghausen e McCullough, modificado por Johnson & Harris) <sup>(58,66,68)</sup>. Este meio disponível comercialmente contém albumina de soro bovino (BSA), ácido oleico e Tween<sup>®</sup> 80 <sup>(58,99)</sup>. Algumas estirpes são mais exigentes como já foi referido, podendo

crescer em meios suplementados com soro de coelho e/ou piruvato, assim como para o seu isolamento <sup>(58)</sup>. Já para amostras clínicas, quando se pretende isolar a bactéria, são adicionados ao meio alguns antibióticos como 5-fluorouracil, gentamicina, ácido nalidíxico, entre outros, de forma a inibir o crescimento de contaminantes <sup>(38,58)</sup>.

As culturas de leptospiras devem ser mantidas, pelo menos entre 13 a 26 semanas, para se verificar a sua positividade. Em meio líquido crescem entre 7 a 10 dias, atingindo neste período, em regra, uma densidade óptima de  $10^8$  bactérias/ml <sup>(27,58,59)</sup>.

Para a preparação dos meios semi-sólidos, é adicionado o agar em baixas “concentrações” (0,1 à 0,2 %) a meio líquido, e o crescimento atinge uma densidade máxima numa zona discreta, abaixo da superfície do meio de cultura, que o torna cada vez mais turvo, à medida que prossegue a incubação. Este crescimento está relacionado com a tensão de oxigénio óptimo, sendo conhecido como anel ou disco de Dinger (**Fig. 1.3**) <sup>(58,102)</sup>



**Figura 1.3** Cultura em meio semi-sólido (formação do anel de Dinger) – Cedido por LLBL, UEI Microbiol.- IHMT-UNL

A conservação das culturas de leptospiras a longo prazo pode ser feita através de liofilização, congelação ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) ou criopreservação ou ainda em meio semi-sólido durante anos entre outros <sup>(2,27,51)</sup>.

## 1.4. Epidemiologia

### 1.4.1. Leptospiras e o ambiente

A Leptospirose é uma zoonose de elevada prevalência entre os animais domésticos, silváticos, e humanos <sup>(86)</sup>. Segundo alguns autores, a ocorrência e a persistência de

leptospiras no ambiente depende de algumas condições climáticas favoráveis, sendo comum em regiões de clima tropical, subtropical e temperado <sup>(33,48,93,99)</sup>. O aumento de águas superficiais, solos contaminados, inundações provocadas por chuvas e desastres naturais, aumentam o risco da doença <sup>(18,78,94,98)</sup>. Porém, também durante os períodos secos, os humanos e animais podem frequentar locais com águas impróprias para o consumo, aumentando o risco da infecção; as actividades recreativas também podem expor a população a ambientes contaminados <sup>(30,73,91,97)</sup>.

A Leptospirose constitui assim, e como já referido, um problema para a Saúde Pública, pois nos últimos anos tem sido uma das zoonoses mais presentes no mundo, com grande impacte social, económico e sanitário, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais. A presença da Leptospirose em áreas rurais deve-se principalmente às actividades agropecuárias predominantes <sup>(10,17, 104)</sup>, e nas áreas urbanas, está presente em locais com saneamento básico inadequado <sup>(4,14,22,28,29,84,88)</sup>.

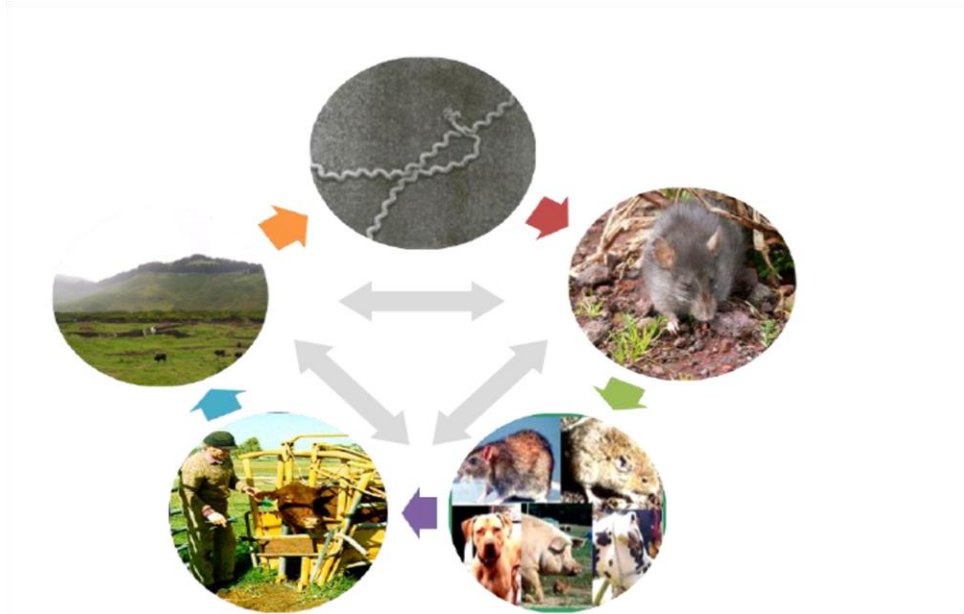
Estes factores propiciam a disseminação e a persistência destas bactérias, predispondo o contacto dos humanos com os referidos ambientes contaminados o que facilita a ocorrência de surtos.

Os estudos epidemiológicos desta doença são complexos devido ao grande número de factores que influenciam a sua propagação, o que dificulta o estabelecimento do perfil epidemiológico entre diferentes regiões geográficas, além do grande número de hospedeiros/reservatórios, que podem estar envolvidos <sup>(4,28,33,73)</sup>. Assim, diferentes espécies de *Leptospira* podem ter hospedeiros de manutenção ou acidentais e estes por sua vez eliminam leptospiras pela urina (leptospiúria) para o ambiente de forma contínua ou intermitente, contribuindo para manter o respectivo ciclo de transmissão<sup>(1,33,38,58)</sup>.

Como já referido anteriormente, os roedores são portadores crónicos que “alojam” leptospiras nos órgãos, preferencialmente nos rins, excretando-as vivas e na forma infectante, por longos períodos através da urina, contaminando o ambiente circundante. Desta forma, diferentes serovares patogénicos podem infectar diferentes mamíferos

como os bovinos, os suínos, ou outros animais de produção pecuária, e também os humanos, estabelecendo-se assim o ciclo de transmissão (**Fig. 1.4**) <sup>(42, 58, 65, 92)</sup>.

Nos animais domésticos, o cão é conhecido como um potencial hospedeiro/ reservatório adaptado, estabelecendo o elo de transmissão entre o rato “portador saudável universal” e os humanos. O cão tem assim um papel importante na epidemiologia da Leptospirose quer nos países de clima tropical quer temperado <sup>(8,10,71,93)</sup>



**Figura 1.4.** Ciclo de transmissão de leptospirosas patogênicas, reservatórios/hospedeiros acidentais (*Adaptado* de Gonçalves, 2009).

O Homem é considerado hospedeiro acidental, sendo rara a transmissão de pessoa a pessoa <sup>(5,74)</sup>. Contudo, a susceptibilidade humana é geral e a infecção normalmente é por serovar – específico, podendo o indivíduo contrair Leptospirose mais de uma vez com o mesmo serovar ou com outro diferente daquele do episódio anterior <sup>(21,37,58)</sup>.

O modo de transmissão das leptospirosas pode ser por contacto directo, através dos animais infectados (silváticos e domésticos) ou indirecto, através de urina dos reservatórios (roedores) e potenciais hospedeiros reservatórios (cães, bovinos), e ainda através de ambientes contaminados <sup>(8,58,65)</sup>.

A entrada das leptospiras nos hospedeiros ocorre através das mucosas (nasofaríngea, labial, conjuntiva, digestiva e genital) da pele lesionada e até pela pele íntegra, aquando da permanência por tempo prolongado, em colecções de águas contaminadas <sup>(66,79,100)</sup>.

#### 1.4.2. Leptospirose humana

A prevalência da Leptospirose em seres humanos depende de vários factores, fundamentalmente da localização geográfica e das condições ecológicas subjacentes aos respectivos hospedeiros de manutenção (reservatórios) existentes <sup>(72,99)</sup>. Às condições ecológicas estão geralmente associadas, algumas situações de risco ocupacional, afectando indivíduos que se dedicam à agricultura e pecuária, veterinários, trabalhadores de saneamento básico (esgotos) e outros <sup>(28,89,97)</sup>. Incluem-se ainda nestes factores de risco alguns comportamentos e hábitos (lavar roupas e beber água dos charcos, riachos que podem estar contaminadas com leptospiras), a realização de certas viagens de “aventura”, actividades recreativas como a canoagem <sup>(38,42,46,48,104)</sup>, jardinagem, pesca e natação em águas doces <sup>(15,58,72,91)</sup>.

Ainda no que respeita à infecção humana sabe-se que alguns serogrupos/serovares têm sido associados a diferentes reservatórios/hospedeiros, à ocupação profissional e ainda às áreas de proveniência/residência da população. Assim por exemplo, o serogrupo Canicola aparece associado aos cães, Icterohaemorrhagiae e Ballum aos ratos, e Hardjo aos bovinos, entre outros (**Tabela 1.1**) <sup>(8,16,42,48,58,71,98,106)</sup>.

**Tabela 1.1.** Reservatórios dos principais serovares de *Leptospira* spp. a nível mundial  
(Adaptado de Bharti, et al. 2003)

| Reservatórios | Serogrupos/Serovares                             |
|---------------|--|
| Ratazanas     | Icterohaemorrhagiae, Ballum Arborea, Copenhageni |
| Canídeos      | Canicola, Bratislava                             |
| Bovinos       | Hardjo, Pomona, Grippytyphosa                    |
| Suínos        | Pomona, Tarassovi                                |
| Cavalos       | Bratislava                                       |
| Marsúpios     | Grippytyphosa                                    |
| Morcegos      | Cynopteri, Wolffi, Sejroe                        |

De acordo com Faine e colaboradores (1999) a Leptospirose face às condições ambientais pode apresentar três padrões epidemiológicos distintos:

1º- Ocorrência em climas temperados – neste tipo de ocorrência estão geralmente envolvidos poucos serovares circulantes, sendo que a infecção humana ocorre quase sempre por contacto directo com animais infectados (bovinos, caprinos e outros);

2º- Ocorrência em regiões tropicais húmidas - existem geralmente muitos serovares que infectam os humanos e os animais, e com elevado número de reservatórios (roedores). A exposição humana não é limitada pela ocupação profissional, resultando com maior frequência da contaminação generalizada do ambiente durante as estações chuvosas;

3º- Ocorrência da infecção em ambiente urbano - nestes locais as leptospirosas podem ser igualmente eliminadas pelos roedores. Apesar desta forma de ocorrência, ser mais reduzida na maior parte dos países, pode tornar-se relevante aquando da degradação de infra-estruturas por situações de guerra ou desastres naturais <sup>(58,78,82)</sup>.

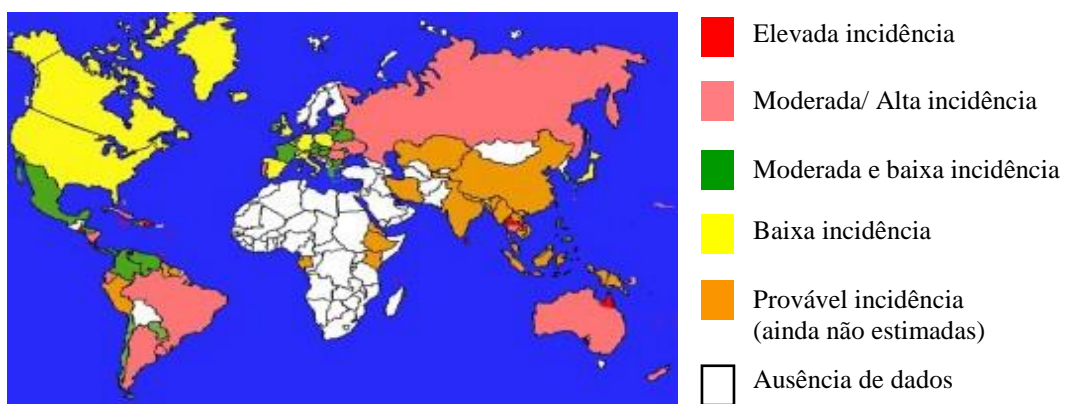
Resumindo, o conhecimento da fonte de infecção, dos serovares prevalentes, bem como dos hospedeiros envolvidos na Leptospirose é uma estratégia de grande importância que deve ser adoptada para o entendimento epidemiológico da doença <sup>(31,76,102)</sup>.

### **1.4.3. Ocorrência e distribuição Mundial**

Como já referido, a Leptospirose é hoje conhecida e considerada uma zoonose de grande importância pela perda socio-económica que envolve a nível mundial. Todos os anos são reportados casos da sua ocorrência por diversas instituições e investigadores <sup>(10,47,84,99)</sup>. A Leptospirose embora seja uma zoonose com maior ocorrência durante o período das chuvas, também são observados e reportados com frequência, casos clínicos e epidemiológicos, relacionados com a exposição agrícola, principalmente em países tropicais <sup>(17,30,35,104)</sup>. Para Ciceroni e colaboradores (2000) o risco de contrair a doença por actividades de lazer está a aumentar em relação à ocupação profissional.

Vários surtos epidémicos e casos esporádicos têm sido descritos em diversos locais do mundo, por exemplo na Europa: França <sup>(19)</sup>, Portugal <sup>(30,99)</sup>, Alemanha <sup>(35)</sup>, Itália <sup>(29)</sup>; Estado Unidos de América <sup>(73)</sup>; Brasil <sup>(84)</sup>; Perú <sup>(28)</sup>; Nicarágua <sup>(87)</sup>; na Ásia: Malásia <sup>(81)</sup>, entre outros. Estes surtos podem também estar associados à mudança de comportamento

humano, às alterações climáticas (ex: EL NIÑO), mudanças na densidade populacional de reservatórios animais, entre outros <sup>(19,65)</sup>. De acordo com as estimativas da WHO (World Health Organization) e ILS (International Leptospirosis Society) ocorrem no mundo cerca de 350.000 a 500.000 casos por ano de Leptospirose, os quais são considerados principalmente como doença ocupacional. Estima-se ainda que existem mais de 1.700.000 casos graves de Leptospirose em todo o mundo, com maior incidência nas populações pobres, de países em desenvolvimento e regiões tropicais <sup>(19,97)</sup>.



**Figura 1. 5.** Distribuição mundial de Leptospirose humana (*Adaptado de Pappas, et al. 2008*).

As áreas endêmicas estão localizadas principalmente na América Central (Nicarágua, Barbados) e do Sul, Caraíbas, bem como no sudeste Asiático (Filipinas) e Oceânia <sup>(61,78)</sup> (**Fig. 1.5**). Segundo Picardeau e colaboradores (2012), a incidência anual varia de 0,1 a 1 caso por 100.000 habitantes em climas temperados e é superior a 10-100 casos por 100.000 habitantes em regiões tropicais.

Relativamente ao continente africano poucos casos de surtos foram registados, principalmente devido a dificuldade de diagnóstico em humanos, sendo por isso a doença considerada negligenciada <sup>(17,70,88,89)</sup>. No entanto, existem alguns registos de prevalência e surtos esporádicos em países como o Quênia <sup>(15,78)</sup>, a Tanzânia <sup>(17)</sup>, os Camarões <sup>(89)</sup> e a África do Sul <sup>(83,88)</sup>.

No Gana e na Etiópia, a seroprevalência foi estimada em 33% e 47,66% <sup>(104)</sup> respectivamente, e no Gabão e na Nigéria foi de 15,7% no primeiro e 18% no segundo <sup>(15)</sup>.

E segundo Machangu' e colaboradores (1997, 2003, 2004) existem mais de 20 serovares descritos em África (Zaire, Quênia, Marrocos e Gana) <sup>(70,104)</sup>.

Particularmente em Angola, não foram encontrados registos de surtos, casos clínicos e epidemiológicos, nem publicações científicas, mas existem referências de casos prevalentes em locais, onde foram realizados alguns estudos, dos quais se destacam: em bovinos na província da Huíla <sup>(12)</sup>, e em humanos nas províncias de Benguela <sup>(42)</sup>; Huambo e Luanda <sup>(40)</sup>.

A globalização no contexto de viagens internacionais (turismo) particularmente para actividades recreativas (desportos aquáticos) e expedições militares, também potencia a doença, em países desenvolvidos <sup>(16,29,46,73,78,91,94)</sup>.

Um dado importante é que as bactérias do género *Leptospira* têm sido detectadas praticamente em todos os países onde se realizam investigações clínicas e epidemiológicas no âmbito da Leptospirose <sup>(48)</sup>.

#### **1.4.4. Importância actual da Leptospirose**

Actualmente a Leptospirose é considerada uma doença ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais, como referido no ponto **1.4.2**. Contudo, estas actividades são praticadas, na sua maioria por pessoas de baixo poder económico, com escassez de recursos tecnológicos e equipamento de segurança, expondo-as directamente às leptospiras <sup>(4,5,51)</sup>. Como consequência observa-se uma elevada incidência de Leptospirose em determinadas áreas, o que leva, para além dos danos pela própria doença, a inúmeras perdas de vidas humanas, elevados custos hospitalares e perdas de dias de trabalho, do que decorre grandes prejuízos sócio-económicos levando à pobreza <sup>(4,48,49,60,61,86)</sup>.

## 1.5. Aspectos clínicos

Como já referido a Leptospirose é uma doença infecciosa que apresenta manifestações clínicas muito variáveis e inespecíficas, com diferentes graus de severidade <sup>(57)</sup>. A infecção varia desde assintomática a subclínica podendo no entanto ocasionar quadros clínicos leves, moderados ou graves com elevada letalidade <sup>(37,58,84)</sup>. A evolução da infecção depende da susceptibilidade do hospedeiro, da quantidade de inóculo e da virulência das leptospiras infectantes <sup>(23,45)</sup>, e ainda, dos órgãos ou sistemas atingidos <sup>(6,28,85)</sup>.

Clinicamente a Leptospirose pode ter duas apresentações: a forma anictérica ou a forma ictérica <sup>(38)</sup>. Em qualquer uma destas formas é possível delinear duas fases distintas de acordo com a evolução da doença, a fase precoce (leptospirémica ou septicémica) e a fase tardia (leptospirúrica ou imunológica) <sup>(44,58)</sup>. No entanto, a mais frequente é a anictérica <sup>(74)</sup>. As manifestações começam logo após o período de incubação. Após a entrada no organismo, as leptospiras são disseminadas pela corrente sanguínea e desaparecem gradualmente da circulação, à medida que surgem os anticorpos específicos, indo depois “alojar-se” em vários órgãos e tecidos, sendo o rim o órgão de eleição <sup>(38,58,99,102)</sup>. O período de incubação varia em média de 7 a 12 dias, embora possa variar entre 2 a 20 dias <sup>(65,99)</sup>.

### Forma Anictérica

Cerca de 90% de casos nesta fase, não têm necessidade de cuidados médicos <sup>(73,99)</sup>, pois curam-se em poucos dias sem deixar sequelas, sendo frequentemente rotulada como síndrome gripal <sup>(5,30)</sup>. Contudo existem casos que exigem maior atenção e que se traduzem numa taxa de mortalidade inferior a 2%, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Como já foi referido esta doença, pode ter uma evolução bifásica sendo:

- ❖ A fase leptospirémica ou septicémica que dura cerca de uma semana, na qual os sinais e sintomas podem regredir ou evoluir. Esta fase é caracterizada pelo início abrupto de febre elevada, calafrios, cefaleias intensas, mialgias, dores abdominais, linfadenopatias, anorexia entre outras, seguindo-se o desaparecimento da febre e

outros sintomas, após o que inicia a fase imunológica, sendo que a sua resolução coincide com o aparecimento de anticorpos específicos <sup>(45,99)</sup>.

- \* A referida fase imunológica é caracterizada então, pela produção de anticorpos anti-*Leptospira* detectáveis em regra a partir do 5º ao 7º dia de início da doença, que fazem com que as leptospiros desapareçam da corrente sanguínea (fenómeno de opsonização), indo “alojar-se” em diferentes órgãos <sup>(1)</sup> sobretudo naquelas que têm um particular tropismo, com maior destaque para os rins e em particular para os túbulos renais onde poderão ser eliminadas pela urina <sup>(58)</sup>.

### **Forma Ictérica**

Historicamente, a presença de icterícia tem sido considerada, como critério para distinguir as formas moderadas e severas ou fulminantes que constituem a síndrome de Weil <sup>(99)</sup>. Clinicamente, é a forma mais severa que evolui de modo progressivo e muitas vezes fatal, com taxas de mortalidade estimadas de 5 a 15% <sup>(21,58,97)</sup> ocorrendo em mais de 20% do número total de casos de Leptospirose conhecidos no mundo <sup>(102)</sup>.

A doença de Weil é uma síndrome multisistêmica, caracterizada pelos sintomas de disfunção hepática, renal e vascular (hemorragias) <sup>(16,38)</sup>. Porém, nos últimos anos aparece frequentemente associada a complicações respiratórias, com formas hemorrágicas graves levando à morte <sup>(73,99)</sup>. Durante a fase de leptospirémica os sintomas podem ser sugestivos entre o 3º e 7º dia, altura que pode surgir a icterícia <sup>(102)</sup>. A presença desta, não implica necessariamente a necrose hepatocelular, pois normalmente as células hepáticas voltam ao funcionamento normal após a recuperação do doente. No entanto, a icterícia pode ser provocada pela insuficiência renal que impede a eliminação da bilirrubina pela urina <sup>(17,100)</sup>. Além das situações já citadas, pode haver outras complicações como a hemorragia pulmonar <sup>(58)</sup> hipotensão, hepatoesplenomegália, insuficiência renal (nefrite), uveíte, meningite e até aborto, entre outras <sup>(58,85,99)</sup>.

Importa no entanto referir que as diversas manifestações clínicas associadas à Leptospirose humana assemelham-se a outras infecções, provocadas por parasitas, vírus

e bactérias, de que são exemplo a malária, hepatite viral, dengue, febre tifóide e outras, o que dificulta o seu diagnóstico.

Em síntese, a fisiopatologia da Leptospirose é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculite (na fase de leptospirémica), lesões endoteliais e infiltração de células inflamatórias.

### **1.5.1. Diagnóstico**

Normalmente o diagnóstico da Leptospirose deve realizar-se através da confirmação da presença do agente ou anticorpos contra ele dirigidos, apoiado em dados epidemiológicos e clínicos <sup>(3,5,16)</sup>.

Os dados epidemiológicos da Leptospirose estão geralmente associados aos factores ambientais e ecológicos, bem como a condições de carência socio-económica que sustentam a perpetuação do agente etiológico (leptospiras) <sup>(30,38)</sup>.

O diagnóstico clínico baseia-se então, nesses dados epidemiológicos e nas manifestações clínicas (sinais e sintomas), considerando sempre o período de incubação da doença e o seu curso bifásico <sup>(5,74,89)</sup>, sendo necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças que cursam com sintomatologia comum <sup>(7,16)</sup>.

Contudo, para determinar a ocorrência de casos de Leptospirose, é indispensável o recurso ao diagnóstico laboratorial através de testes bacteriológicos, serológicos e moleculares <sup>(38)</sup>, os quais serão referidos com mais detalhe nas próximas páginas.

### **1.5.2. Diagnóstico laboratorial**

Em virtude da diversidade inespecífica do quadro clínico da Leptospirose <sup>(2)</sup> há necessidade de recorrer aos testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico. Assim, os exames laboratoriais, para além de confirmar o agente, permitem compreender alguns aspectos epidemiológicos, como o conhecimento dos serovares circulantes numa dada região, a fonte de infecção, o modo de transmissão e os potenciais reservatórios, dados indispensáveis no contexto da Saúde Pública para a implementação de medidas de prevenção e controlo <sup>(3,38,42,99)</sup>.

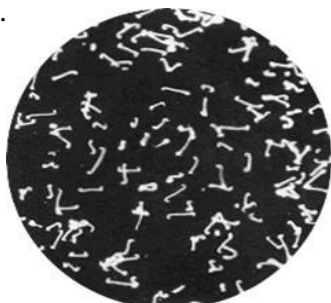
O diagnóstico laboratorial baseia-se na pesquisa do agente causal da doença, que pode ser feita, por métodos directos, através de microscopia de fundo escuro, obtenção “*in vitro*” de isolados (cultura), detecção do respectivo DNA (PCR), e ainda por métodos indirectos que permitem a detecção de anticorpos específicos anti-*Leptospira interrogans* (s.l.) em circulação <sup>(6,38,44,52,68)</sup>. A escolha dos métodos a utilizar e do material biológico, depende da fase evolutiva da infecção <sup>(99)</sup>. Na fase aguda ou leptospirémica durante o período febril, as leptospiras podem ser observadas directamente no sangue, líquor, ou por cultura em meio apropriado ou ainda, a partir da inoculação em animais de laboratório <sup>(5,80)</sup>.

Pelas dificuldades inerentes à realização de técnicas bacteriológicas, os exames serológicos são os mais indicados para o diagnóstico da Leptospirose <sup>(27,50)</sup> sendo que, nos primeiros dias da infecção, a opção útil é a utilização da técnica de PCR, por não haver ainda anticorpos em circulação <sup>(20,21 24,54,55)</sup>.

### 1.5.3. Métodos Directos

#### ❖ Microscopia de fundo escuro

Várias técnicas são utilizadas para a observação directa de leptospiras. Devido às suas diminutas dimensões estas bactérias podem ser visualizadas no material biológico por meio de microscopia de fundo escuro (**Fig. 1.6**), embora para posterior cultura seja, necessário cerca de  $10^4$  bactérias/ml de inóculo no mínimo <sup>(58,80)</sup>. Este método permite um resultado imediato, quando desenvolvido por pessoal especializado. Contudo, o método apresenta uma sensibilidade e especificidade baixa <sup>(50)</sup>, requerendo microrganismos intactos e de preferência viáveis <sup>(2,59)</sup>. A observação do movimento único que caracteriza estes microrganismos assegura um resultado positivo <sup>(44)</sup>, mas o método também possui limitações, podendo dar azo a resultados falsos negativos se o número de bactérias presentes na amostra for reduzido e não apresentar o referido movimento <sup>(38,58)</sup>.



**Figura 1. 6.** Visualização de *Leptospira* spp. em microscopia de fundo escuro-fotografia x 200. (Adaptado de Carreira, 2009).

### ❖ Isolamento Bacteriano (Cultura)

O isolamento por cultura é o método mais sensível, que demonstra a presença das leptospiros, permitindo assim, a respectiva identificação. Este método é considerado “*Gold-standard*” para o diagnóstico da Leptospirose <sup>(50)</sup> embora a cultura necessite de várias semanas para se revelar positiva. É um processo demorado com taxas de crescimento muito baixas, aliado por vezes a contaminações concomitantes com microrganismos de crescimento mais rápido <sup>(38,56,63)</sup>. A par das dificuldades relacionadas com a execução desta técnica, a mesma também não é adaptada como técnica de rotina <sup>(59)</sup>. Apesar de detectar leptospiros presentes nos tecidos de órgãos como o rim, nos fluídos orgânicos como é o caso de amostras de urina (urocultura) ou sangue (hemocultura) <sup>[99]</sup>.

É de referir que a eficiência deste método depende da ausência de resíduos de antibióticos, da reduzida autólise tecidual e de condições óptimas para a conservação do material a cultivar, após a colheita, em particular de tecido renal, e no caso de amostras de urina, obriga a um procedimento imediato, pois as leptospiros não sobrevivem num meio com pH ácido <sup>(56,99)</sup>.

### ❖ Amplificação do DNA (PCR)

A técnica de PCR, [Polymerase, Chain Reaction (= Reacção em Cadeia de Polimerase)] tem sido referida, como uma das mais promissoras para o diagnóstico precoce da Leptospirose, dada a crescente importância da amplificação do DNA leptospírico em particular em situações onde exista atraso ou mesmo ausência da resposta imunológica <sup>(13,16,24,44,52,55,66,95)</sup>.

Esta técnica consiste na amplificação dos fragmentos específicos de DNA de *Leptospira* spp. no material biológico como: soro, sangue, urina, líquido e directamente de tecidos (*post-mortem*) de diferentes órgãos <sup>(24,52,67,99)</sup>. Apesar de ser uma técnica dispendiosa, a sua utilização apresenta vantagens desde logo, pela rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade e especificidade que permite amplificar uma quantidade mínima de DNA que exista na amostra <sup>(6)</sup>, contribuindo para a detecção do agente logo no início da doença ou ainda em caso de surtos epidemiológicos, uma vez que a identificação

precoce do agente, possibilita a actuação de procedimentos eficazes no controlo e tratamento da respectiva infecção <sup>(16,44,56,105)</sup>.

Por outro lado, as dificuldades associadas à realização dos testes serológicos nos isolados clínicos têm promovido, a aplicação desta técnica na identificação molecular das bactérias como é o caso das leptospiros <sup>(92)</sup>. Com efeito, pode diferenciar entre espécies patogénicas e não patogénicas, embora outros estudos são necessários para identificação dos serogrupos e os respectivos serovares, e ainda pode ser utilizada em doentes que já tenham iniciado o uso de antibiótico <sup>(16,80)</sup>.

#### **1.5.4. Métodos Indirectos**

Devido ao carácter bifásico da Leptospirose, e à limitação de algumas técnicas em detectar os anticorpos na fase imune, os métodos indirectos baseiam-se em reacções serológicas, como a principal prova do diagnóstico laboratorial, <sup>(44)</sup>. Cada um dos métodos apresenta a sua respectiva sensibilidade e especificidade <sup>(99)</sup>. As principais técnicas são: técnica de Aglutinação Macroscópica sobre a lâmina, técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), ambas utilizadas como rastreio, e a técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) que é a técnica de referência, preconizada pela OMS, até à presente data <sup>(99,102)</sup>.

##### **❖ Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACRO)**

A técnica MACRO é uma das técnicas serológicas usadas para rastreio. Baseia-se na observação de reacções de aglutinação visíveis, sobre uma lâmina de vidro ou outro suporte quando o soro “problema” reage com o antigénio inactivado (reacção antigénio-anticorpo) <sup>(30,42,44)</sup>. Os resultados duvidosos (não conclusivos) e positivos devem no entanto ser sempre confirmados pela técnica de referência (TAM) <sup>[102]</sup>.

As vantagens desta técnica são a sua execução rápida e fácil, permitindo analisar um número elevado de amostras, a baixo custo e sem nenhum suporte especializado <sup>(42)</sup> e, comparativamente com a TAM não necessita o uso de antigénios vivos <sup>(99)</sup>. Acrescenta-se ainda o facto de poder ser implementada em áreas, onde não haja laboratório de referência <sup>(30,44)</sup>. A referida técnica apresenta uma sensibilidade na ordem dos 95% e

uma especificidade de 93% <sup>(44)</sup>. Porém, pode produzir resultados duvidosos, devido a reacções cruzadas entre serovares ou com agentes de outras patologias <sup>(27,63)</sup>

#### ❖ **Testes Rápidos (Dipstick tests) / *Leptospira* spp.)**

São testes imunocromatográficos, para a detecção rápida e específica de anticorpos (IgM / IgG) para *Leptospira interrogans* (s.l.) em soro, plasma ou sangue. Semelhante ao que acontece com os testes (MACRO, ELISA) os antigénios vêm inactivados e fixos em substratos sólidos <sup>(7,59)</sup>. Podendo-se encontrar várias marcas no mercado tais como: Lepto Dipstick (SD bioline *Leptospira* IgM/ IgG), teste Hemaglutinação Indirecta (THI), entre outros <sup>(11,36,59,102)</sup>. Estes testes utilizam uma membrana revestida com extractos celulares totais ou uma proteína específica usada para capturar os anticorpos alvo de leptospiros, quando uma gota de amostra é depositada. A captura de anticorpos é visualizada por uma reacção colorimétrica <sup>(80)</sup>.

Estes testes têm a vantagem em relação à TAM, de dar um resultado rápido sem haver necessidade de baterias de culturas vivas <sup>(16,69)</sup>. São práticos e estão disponíveis comercialmente e são fáceis de realizar na prática laboratorial, principalmente nos países em desenvolvimento, os reagentes são estáveis não necessitando de refrigeração para a sua conservação <sup>(32,99)</sup>.

Porém uma das desvantagens destes testes é a sua limitada especificidade, pois não abrangem todos os serovares podendo assim, não estarem ajustados para a área onde estão a ser usados, uma vez que os serovares circulantes podem variar de região para região <sup>(80)</sup>.

#### ❖ **Técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)**

É uma técnica de rastreio, permite detectar anticorpos IgM, durante a 1ª semana da infecção, na fase aguda bem como na detecção tardia de IgG <sup>(2,59,80,100,103)</sup>. Aplica-se normalmente em estudos epidemiológicos, para determinar a seroprevalência da Leptospirose <sup>(103)</sup> e apresenta uma execução relativamente simples. Este teste pode ser adquirido em kits comerciais ou de preparação “*in house*”, e para este último, a preparação do antigénio e a respectiva fixação ao suporte sólido (placa de

microtitulação), deve merecer atenção, para assegurar a eficácia do teste e fiabilidade dos resultados <sup>(92,99)</sup>.

Este teste tem uma sensibilidade de 100%, sendo mesmo superior à observada pela técnica de referência (TAM), pois pode detectar mais precocemente a resposta imune, possibilitando assim, a correlação entre os resultados e o tempo de infecção, para além de poder utilizar também fragmentos bacterianos inactivados, sem necessitar de antigénios vivos <sup>(7,74,92)</sup>. No entanto a sua especificidade é baixa comparativamente com a da TAM, pois a identificação do serovar não é obtido por este teste.

### ❖ Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

É a técnica considerada *Gold standard*, para o diagnóstico da Leptospirose, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), foi desenvolvida por MARTIN & PETIT (1918), posteriormente modificada por Borg-Petersenii <sup>(30,102)</sup>, permanece a única técnica que permite a identificação presuntiva do serogrupos e da estirpe infectante <sup>(80,99)</sup>.

É um teste serológico utilizado para detecção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* (s.l.), no soro “problema”. Consiste numa reacção antigénio-anticorpo, utilizando uma bateria de antigénios vivos que inclui geralmente entre 18-24 serovares de *Leptospira interrogans* (s.l.), com representação dos principais serogrupos, incluindo o serovar (Patoc) de *L. biflexa* (**Tabela 1.2**).

É fundamental incluir pelo menos um serovar isolado localmente, para incrementar a sensibilidade do teste <sup>(102)</sup>.

A reacção dos antigénios e do soro “problema” é traduzida em diferentes tipos de aglutinação <sup>(102)</sup>, visíveis apenas em microscópio do fundo escuro <sup>(80)</sup>. O seu princípio baseia-se na incubação do soro diluído (soro do doente) com vários serovares/estirpes de *Leptospira spp.* <sup>(102)</sup>. É realizada em microplaca de fundo plano, utilizando então soros diluídos inicialmente numa diluição 1:50 (diluição de rastreio) e posteriormente em diluições seriadas ao dobro para os serovares que tenham sido reactivos <sup>(30,44,99)</sup>.

**Tabela 1.2.** Exemplo de uma bateria de referência de serovares de *Leptospira* spp. recomendada para o diagnóstico imunológico de Leptospirose (TAM), <sup>(102)</sup>.

| Serogrupos                 | Serovares           | Estirpes        |
|----------------------------|---------------------|-----------------|
| <b>Australis</b>           | Australis           | Ballico         |
| <b>Autumnalis</b>          | Autumnalis          | Akiyami A       |
| <b>Ballum</b>              | Castellonis         | Castellón 3     |
| <b>Bataviae</b>            | Bataviae            | Swart           |
| <b>Canicola</b>            | Canicola            | Hond Utrecht IV |
| <b>Cynopteri</b>           | Cynopteri           | 3522 C          |
| <b>Grippotyphosa</b>       | Valbuzzi            | Valbuzzi        |
| <b>Hebdomadis</b>          | Hebdomadis          | Hebdomadis      |
| <b>Icterohaemorrhagiae</b> | Icterohaemorrhagiae | RGA             |
| <b>Icterohaemorrhagiae</b> | Copenhageni         | M20             |
| <b>Javanica</b>            | Poi                 | Poi             |
| <b>Panama</b>              | Panama              | CZ 214          |
| <b>Pomona</b>              | Mozdok              | 5621            |
| <b>Pyrogenes</b>           | Pyrogenes           | Salinem         |
| <b>Sejroe</b>              | Sejroe              | M 84            |
| <b>Sejroe</b>              | Wolffi              | 3705            |
| <b>Tarassovi</b>           | Tarassovi           | Perepeletsin    |
| <b>Semarang *</b>          | Patoc               | Patoc I         |

\*Serogrupo saprófita (*L. biflexa* s.l.)

Considera-se o resultado positivo quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas em comparação com as testemunhas (controlo negativo), a partir da diluição mínima de 1:100 <sup>(80,102)</sup>.

A utilização e manutenção de uma bateria de referência constituída por culturas vivas faz com que a execução da TAM não seja generalizada a todos os laboratórios clínicos <sup>(58,59)</sup>. Para além disso outras limitações são conhecidas tais como: a necessidade de obter duas amostras séricas distintas, uma colhida na fase aguda da doença e a segunda, colhida numa fase mais tardia, de modo a permitir um acompanhamento da cinética dos anticorpos específicos, e a sua ineficácia na fase precoce da doença.

Contudo, apresenta certas vantagens por estabelecer um diagnóstico definitivo com a determinação de serogrupos de estirpe infectantes, permitindo assim o conhecimento de serovares circulantes na região. Este teste também permite apoiar o clínico sobre a evolução do doente, e contribuir para programas de vigilância epidemiológica,

reduzindo o impacto da Leptospirose na comunidade <sup>(99)</sup>. No entanto, exige um laboratório especializado (de referência) e pessoal técnico bem treinado <sup>(99,102)</sup>.

A diversidade apresentada por vários serovares demonstra a necessidade de uma correcta identificação, uma vez que estes microrganismos têm uma importante participação nos episódios das infecções humanas e animais <sup>(63)</sup>.

Vários autores afirmam que, apesar da existência de várias técnicas laboratoriais para o diagnóstico da Leptospirose, a grande maioria apresenta limitações <sup>(6)</sup>. Não existem técnicas perfeitas, e suficientemente capazes de analisar, com uma única amostra de sangue ou urina, eficientemente e a baixo custo. Salienta-se ainda, que os testes disponíveis apresentam diferença na capacidade de detecção da bactéria ou anticorpos <sup>(67,68)</sup>. Por exemplo: *i*) a TAM é usada apenas em laboratórios de referência; *ii*) o isolamento em cultura requer um tempo de incubação longo, o que não permite o diagnóstico rápido; *iii*) a PCR, em amostra de sangue é possível apenas nos primeiros dias de evolução da doença. Sendo assim, há necessidade urgente de desenvolver novas técnicas sensíveis e específicas, capazes de detectar anticorpos ou antígenos, de forma rápida e fácil, nas duas fases evolutivas da doença <sup>(68,80,104)</sup>.

## 1.6. Tratamento, Medidas de Prevenção e controlo

### 1.6.1. Terapêutica

O tratamento da Leptospirose humana depende da gravidade e da duração dos sintomas. Em casos menos graves é apenas sintomáticos, os doentes devem procurar o médico, se surgir icterícia <sup>(58)</sup>. A efectividade terapêutica depende do diagnóstico precoce da doença, sendo o seu objectivo, controlar a infecção, impedir que se instale e progrida para formas mais graves da doença principalmente as que implicam complicações renais <sup>(45)</sup>.

A terapêutica é sobretudo baseada na hidratação e administração de antibióticos <sup>(27)</sup> e algumas medidas de suporte dependentemente da situação. Devido a maior tendência em provocar hemorragias é contra-indicado o uso de analgésicos como o Ácido Acetilsalicílico AAS (*Aspirina*<sup>®</sup>) <sup>(64)</sup>. A eficácia de antibioterapia na Leptospirose humana é controversa <sup>(74)</sup> assim, os antibióticos mais usados são: Doxiciclina,

recomendado para a profilaxia, e tratamento de alguns casos menos graves, Amoxicilina e Ampicilina para casos moderados, a Penicilina cristalizada entre outros, é usada para casos graves <sup>(16,45,63)</sup>. O tratamento de suporte depende da gravidade da infecção e da presença de complicações <sup>(102)</sup>.

A instituição de antibióticos na fase inicial da doença tem apresentado resultados satisfatórios <sup>(37)</sup>.

### 1.6.2. Medidas de Prevenção e Controlo

O perfil epidemiológico da Leptospirose humana está associado a vários factores bióticos e geoclimáticos <sup>(30)</sup> como: a presença de roedores, animais domésticos e selvagens, susceptivelmente contaminados; uma ampla variedade de ocupações em áreas rurais e urbanas; estações chuvosas com precipitação abundantes (enchentes); e também nos países em desenvolvimento com condições de infra-estruturas inadequadas e com saneamento precário <sup>(16,38,58,80)</sup>.

Neste contexto é útil que adoptem programas de vigilância epidemiológica como: *i*) prevenção e controlo animal (vacinação dos mais susceptíveis) <sup>[5,84]</sup>; *ii*) controlo das populações de roedores (desratização) <sup>[48,93]</sup>; *iii*) vacinação e quimioprofilaxia dos grupos de risco <sup>[45]</sup>; *iv*) drenagem e esgotos em áreas alagadas; *v*) higiene e saneamento, bem como o uso de equipamentos e materiais de protecção <sup>[73]</sup>; *vi*) e melhores condições de habitação para as populações <sup>[4,22,51,82]</sup>. A presença de detergentes, também reduz a persistência da bactéria, uma vez que ela é inibida em baixas concentrações <sup>(82)</sup> tudo isto contribui de certa forma para a redução de casos associados a estes factores <sup>(58)</sup>.

Alguns autores consideram a quimioprofilaxia com *Doxiciclina* adequada à prevenção pré e pós exposição de indivíduos sob risco por um determinado período, principalmente para viajantes em áreas endémicas <sup>(16, 45, 64, 74)</sup>.

Em conclusão e de acordo com vários autores, podemos dizer que o controlo e prevenção da Leptospirose visa sobre tudo as acções que contribuem para: *i)* a diminuição de leptospiras presentes no ambiente; *ii)* a identificação e eliminação de factores que ampliam a sobrevivência do agente, e *iii)* sem esquecer o esclarecimento da população sobre a doença, através das acções educativas sobretudo nos grupos considerados de risco.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

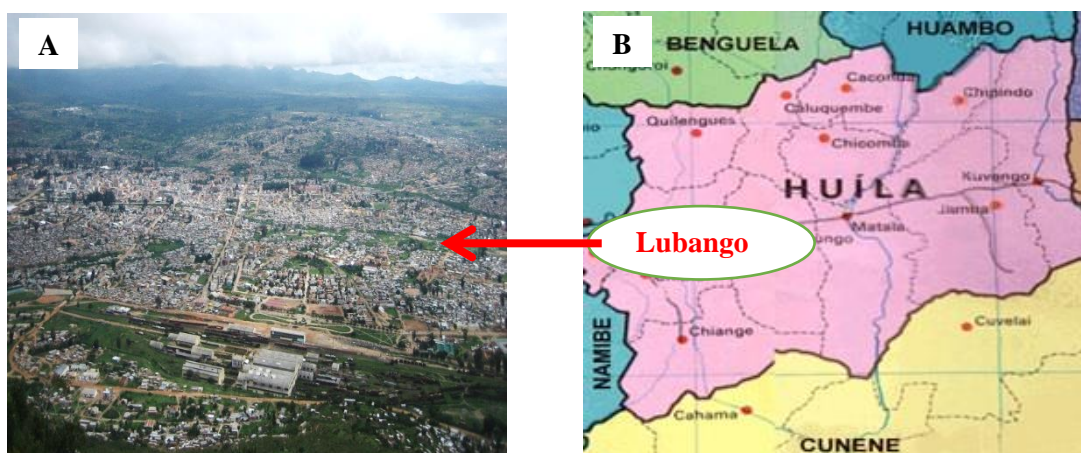
---

### 2.1. População alvo e selecção da amostra

#### 2.1.1. Local do estudo

O presente estudo foi realizado no Hospital Central Dr. António Agostinho Neto, situado no Município do Lubango, Província da Huíla – Angola.

O Lubango, capital de província, situa-se ao sul do País, numa região de clima tropical e temperado, encontra-se rodeada de montanhas. Possui uma altitude de 1.774 metros acima do nível do mar, e compreende uma extensão territorial de 3.140 km<sup>2</sup>. O clima apresenta dois períodos de chuva, um período curto (Outubro a Dezembro), outro longo (Janeiro a Abril) e um Inverno “cacimbo ” (seco). A cidade do Lubango é classificada como uma área urbana e suburbana, (Figura 2.1 A e B).



**Figura 2.1 A** - Imagem aérea da cidade do Lubango (Adaptado de Erik kritensem, 2007); in <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Lubango.jpg> (Acedido em 13-05-2013)

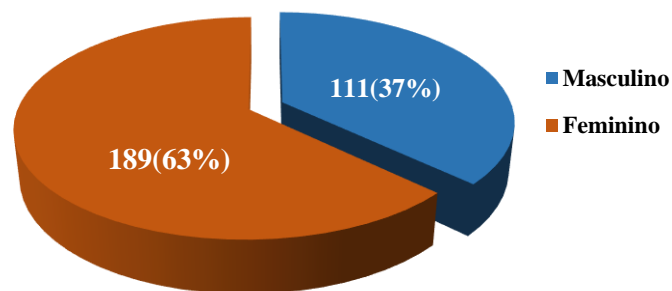
**B** - Mapa da província da Huíla com destaque para a região do Lubango. (Adaptado de agencia angola press, 2008) in [http://www.portalangop.co.ao/provincias/provincia.jsp?title=Huíla&module=dc348acb-2d31-4edb-848c-cc5e39541](http://www.portalangop.co.ao/provincias/provincia.jsp?title=Hu%C3%ADla&module=dc348acb-2d31-4edb-848c-cc5e39541) (Acedido em 13-05-2013).

Lubango, apesar de ter sido concebida para uma população de 318 mil habitantes, actualmente a mesma é estimada em cerca de 1 milhão de habitantes, de acordo com o censo piloto estatístico provincial de 2011, sendo a agro-pecuária actividade predominante.

O Hospital Central é uma instituição pública de referência, com uma capacidade de 520 camas. Possui uma média de atendimento mensal em Consultas Externas e Banco de Urgência, de 17.143 doentes de várias patologias, sendo a malária a mais frequente com uma média de 1.519 casos mês e 22 óbitos, de acordo com dados recolhidos da secção de estatística do referido Hospital.

### 2.1.2. Amostragem e critérios de inclusão

A população alvo do estudo foi constituída por um total de 300 doentes, dos quais 111 (37%) homens e 189 (63%) mulheres (**Fig. 2.2**). Do ponto de vista etário 240 dos doentes tinham acima de 14 anos e 60 (20%) crianças (0-14 anos). Todos atendidos no Banco de Urgência, Consultas Externas e Serviços de internamento em Medicina Clínica pediátrica e de adultos, do Hospital acima referido, no período de Setembro a Dezembro de 2012.



**Figura 2.2.** Representação gráfica da distribuição dos doentes (N=300) por género

A selecção da amostra teve por base três critérios:

- I) Doentes que apresentavam principalmente febre de início súbito, cefaleias, mialgias independentemente de outros sintomas de causa desconhecida;
- II) Doentes febris internados ou não, com diagnóstico clínico de malária, mas com gota espessa negativa (teste de malária);
- III) Doentes internados que apresentaram outros (diagnósticos clínicos) compatíveis com da Leptospirose, como hepatite, insuficiência renal, febre tifóide; meningite, hemoptises, e outros.

O estudo foi conduzido após a aprovação do Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, (**Anexo I**) e do Comité de Ética de saúde de Angola (**Anexo Ia**)

Foi também preparado uma Declaração de Consentimento Informado, para garantir a participação voluntária dos doentes no estudo. A informação prévia sobre a Leptospirose, foi dada aos doentes, devidamente elaborada e explicada, e no caso de menores ou incapacitados, aos seus familiares, (**Anexo II e IIa**). Contudo, só foram feitas as colheitas após a aceitação e assinatura dos mesmos (**Fig. 2.3 A**). No entanto, a informação sobre o estudo e os seus objectivos foi transmitida de forma individual, dando sempre a possibilidade do doente poder recusar caso o entendesse, além de que foi garantindo o anonimato do mesmo.

### **2.1.3. Recolha de amostras e dados clínicos-epidemiológicos**

#### **Inquérito Clínico-epidemiológico**

Os dados dos doentes foram recolhidos através de uma ficha de inquérito (**Anexo III**), previamente codificada para posterior cruzamento de informação sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos da população alvo tais como: a proveniência/residência; ocupação profissional; práticas e atitudes face ao risco de exposição às leptospiras (contacto com roedores/ hospedeiros potenciais nas residências ou próximo delas; consumo/contacto de água não tratada, viagens e outras situações; saneamento básico;

além da idade, género, bem como as respectivas manifestações clínicas e início dos sinais e sintomas.

É de salientar que cada inquérito foi devidamente identificado com o número atribuído a cada doente.

Uma vez que a colheita de amostras foi realizada em três serviços diferentes, (Banco de Urgência, Consultas Externas e Internamento) como já referido, sendo a autora a executora e mentora principal, (**Fig. 2.3 B**) foi necessário estabelecer uma escala de 15 dias por cada serviço. Entretanto, as colheitas nas Consultas Externas e Serviço de Internamento foram feitas das 6 às 8 horas da manhã, antes da administração terapêutica e do pequeno-almoço dos doentes. Todavia, após a nossa identificação e a obtenção do consentimento do doente era realizado o inquérito, seguindo-se a punção venosa. Já para os doentes do Serviço de Urgência o procedimento foi o mesmo, embora sem horário definido para as colheitas, apenas aguardando a ocorrência dos mesmos ao referido Serviço.

Os dados clínicos dos doentes internados também foram obtidos através da observação e consulta de processos de internamento.



**Figura 2.3 A** - Assinatura da Declaração de Consentimento; **B** - Colheita de sangue a doente internada nos serviços de Medicina do HC (Setembro 2012) (*fotos originais da autora*).

### ❖ **Obtenção de amostras séricas**

O soro foi obtido a partir de uma amostra de sangue, colhida por punção venosa e/ou de artérias superficiais, numa quantidade de 4-5 ml, observando sempre os procedimentos e técnicas de assépsia. Em seguida o sangue era colocado num tubo de centrífuga de vidro (10 ml) devidamente esterilizado, identificado com o número do doente correspondente ao número do inquérito e do consentimento informado; cada amostra de sangue colhida, após coagulação, foi centrifugada para separação do soro, utilizando-se uma centrífuga (*Fisher scientific model 228,2000Park lane, Pittsburg.PA 15275*) a 1.500 rpm durante 8 - 10 minutos.

Após a centrifugação, com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril o soro era decantado e acondicionado em microtubos de plásticos de 1,5ml (Eppendorf®) devidamente aliquotados, etiquetados e identificados tal como era feito para os tubos de centrífuga, estes tubos eram colocados em suportes específicos para conservação e transporte selados com Parafilm® e armazenados de acordo com a literatura, à temperatura de -20°C<sup>(37)</sup>. As amostras foram transportadas em recipientes isotérmicos, com gelo seco até ao Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (Laboratório de referência) (L&LB), do Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa (IHMT- UNL), Portugal, onde foi desenvolvida toda a componente laboratorial do presente estudo.

### ❖ **Testes e procedimentos laboratoriais**

(Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme, IHMT, UNL)

O soro da população alvo devidamente identificado e conservado foi submetido aos testes MACROLepto, Dipstick Lepto (kit comercial), TAM, e PCR. Numa 1ª fase o critério para a escolha do teste a realizar foi o número de dias de evolução dos sintomas (**Tabela 2.1**).

**Tabela 2.1.** Distribuição de amostras de acordo com as técnicas realizadas *versus* dias de evolução da doença.

| Testes Realizados | Nº de amostras analisadas | Nº de dias de evolução da doença     |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| MACROLepto        | 300                       | Todos foram rastreados               |
| Dipstick Lepto    | 75                        | > 4 e < 10 dias                      |
| TAM               | 300                       | > 6 dias + NEG/ PCR, POS e NC/ Macro |
| PCR               | 193                       | ≤ 7 dias                             |

## 2.2. Testes Serológicos

### 2.2.1. Teste de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto)

No laboratório fez-se a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans*, começando com o teste de rastreio MACROLepto, sobre lâmina, (**Fig.2.4**) cujo procedimento se descreve no (**Anexo IV**)



**Figura 2.4.** Representação esquemática do teste sorológico de rastreio da Leptospirose: Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre lâmina (MACROLepto) (*Adaptado de Gonçalves, 2009*).

O teste foi realizado com antigénio inactivado previamente preparado, com base em leptopiras pertencentes ao serogrupo/serovar Ballum Arborea de *L. interrogans* da bateria de referência existente no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme da Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Microbiologia Médica do IHMT.

Este antigénio foi testado em soros humanos com resultado positivo e negativo previamente conhecido para Leptospirose e usados para verificar a reactividade, dos antigénios comparando a reacção de aglutininas anti- *L. interrogans* <sup>(20, 102)</sup>. Este teste permite obter um resultado em aproximadamente quatro minutos.

### **2.2.2. Teste Rápido (SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG)**

Para comparar a especificidade e sensibilidade do teste de rastreio (preparação “*in house*” e os comercialmente disponíveis) foram seleccionadas 75 amostras submetidas ao teste Dipstick Lepto (SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG). Estas amostras tiveram inicialmente com resultado positivo e não conclusivo na MACROLepto e correspondiam a doentes já referidos com evolução entre os quatro e os dez dias (> 4 e <10 dias), febris e sem terem feito uso de antibióticos. O teste SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG é um ensaio imunocromatográfico, sendo um teste de aplicação laboratorial rápida e simples.

## **Procedimento**

Após a homogeneização (vortex) do soro, e com auxílio de uma micropipeta de 5µl, colocou-se o soro no primeiro compartimento da placa ou substrato devidamente identificada, com o número da amostra do doente, após o que se colocam quatro gotas de solução antigénica no segundo compartimento, e depois de 20 minutos interpretam-se os resultados (**Fig. 2.5**).



**Figura 2.5.** Imagem de teste Dipstick Lepto (SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG).  
(foto original da autora)

### 2.2.3. Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)

A TAM, técnica de referência, foi realizada utilizando uma bateria de referência existente no laboratório, constituída por antígenos vivos, cada um dos quais com uma densidade de  $10^8$  bactérias/ml, mantidas em EMJH, incluindo 24 serovares pertencentes a 16 serogrupos de *L. interrogans* (**Anexo V**), e ainda o serovar Patoc, como representante da espécie saprófita *L. biflexa*. A observação dos testes (placas) foi feita em microscópio do fundo escuro (**Fig.2.6**).



**Figura 2.6.** Observação no microscópio de fundo escuro das placas utilizadas na TAM com os soros dos doentes estudados. (foto original da autora).

Para o efeito foram estabelecidos dois grupos de amostras, estudadas por fase de evolução:

- ❖ O 1º lote de amostras de soro foi seleccionado tendo em conta o número de dias de evolução da doença;
- ❖ O 2º grupo foi constituído por amostras de soro, teoricamente consideradas negativas em diagnóstico molecular (PCR) e com resultado positivo e não conclusivo no teste MACROLepto.

Por sua vez, o teste foi realizado em duas etapas:

- ❖ 1ª Etapa - os soros foram analisadas numa diluição de rastreio de 1:50, para determinar os serovares reactivos. Sendo os soros considerados reactivos os que evidenciaram pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas.
- ❖ 2ª Etapa - os soros foram submetidos a diluições seriadas ao dobro para determinar o título correspondente à diluição final para os antígenos reactivos (1ª etapa), permitindo então a definição e fixação dos resultados (títulos).

A seropositividade foi estabelecida de acordo com os critérios preconizados pela OMS/ILS, onde o limiar positivo está fixado num título igual ou superior a 1:100, com qualquer um dos antígenos reactivos de *L. interrogans*, para as áreas conhecidas como não endémicas<sup>(38)</sup>. No entanto, neste caso, como não se conhecia a seroprevalência da Leptospirose na região do Lubango e este ser um estudo de rastreio não foi possível obter a 2ª amostra para poder cumprir com as exigências da TAM, e confirmar os resultados através da cinética dos anticorpos. Todavia foram consideradas positivas as amostras cuja reacção mostrou um título igual ou superior a 1:100. A descrição da técnica é apresentada no **Anexo V**.

## 2.3. Testes Moleculares

### 2.3.1. Extracção de DNA em amostras de soro

A extracção de DNA das amostras de soro em estudo, foi realizada através do kit “Citogene® DNA Cell and Tissue”, comercializado pela Citomed, de acordo com as recomendações do fabricante e adaptado pelo laboratório, cuja descrição está em anexo (**Anexo VI**).

Inicialmente só se consideraram os soros de doentes com um a sete (1 - 7) dias de evolução. Posteriormente, foram também seleccionadas algumas amostras com resultado negativo pela TAM, cujos doentes haviam mostrado terem tido exposição ao risco de Leptospirose antes da colheita. As amostras (*templates*) foram conservadas sob refrigeração a 4°C até análise posterior pela PCR.

### 2.3.2. Amplificação de DNA (PCR)

Muito do sucesso da técnica da PCR está no rigor da selecção e preparação das sequências oligonucleotídicas iniciadores (*primers*) e, conseqüentemente, pela respectiva homologia com o DNA alvo <sup>(6, 30)</sup>.

Para amplificação do DNA leptospírico foram utilizados os *primers* hap1 cujas sequências oligonucleotídicas foram desenhadas a partir do respectivo gene (*hemolysis-associated proteín1*), que codifica a proteína de superfície associada à hemólise e é específico das leptospiros patogénicas <sup>(21,56)</sup>. As sequências foram assim obtidas do serovar Pomona, amplificando um fragmento de 262pb de acordo com Leon e colaboradores 2006 <sup>(56)</sup> (**Tabela 2.2**).

**Tabela 2.2.** *Primers* hap1 usado na amplificação do DNA.

| Gene        | <i>Primers</i> | Sequências nucleotídicas     | Tamanho do fragmento (pb) |
|-------------|----------------|------------------------------|---------------------------|
| <i>hap1</i> | <i>Forward</i> | 5'-GCAAGCATTACCGCTTGTGG - 3' | 262 pb                    |
|             | <i>Reverse</i> | 5'-TGTTGGGGAAATCATACGAAC-3'  |                           |

Antes de se realizar o teste de PCR foi determinada a especificidade e a sensibilidade dos referidos *primers*.

Assim, para a determinação da especificidade foram utilizadas amostras de DNA extraído de microrganismos distintos previamente conhecidos e representantes de outros géneros de espiroquetídeos como *Borrelia burgdorferi* sensu lato e *Treponema pallidum*, além de leptospiros pertencentes aos serogrupos/estirpes (Ballum, Icterohaemorrhagiae/RGA de *L. interrogans*, Patoc de *L. biflexa* e ainda de *L. inadai* (espécie considerada intermédia entre as patogénicas e as saprófitas). Foi também incluída uma amostra de água autoclavada como controlo negativo.

Para o teste de sensibilidade usou-se como molde DNA extraído de culturas vivas dos serovares/estirpes RGA, Canicola entre outros de *L. interrogans* com uma densidade de  $10^8$  bactérias /ml em nove diluições seriadas de base 10, até 1 bactéria/ ml, quantificação também realizada no equipamento NanoDrop<sup>®</sup> da Thermo Scientific 1000, para ver a absorvência, concentração e pureza do DNA obtido.

Determinada a sensibilidade e especificidade dos “*primers*” e tendo-se verificado que os mesmos estavam em condições de utilização, procedeu-se à amplificação do DNA das amostras em estudo. Para a reacção de amplificação foi realizada uma mix (mistura) com o volume final de 25µl com componentes indicados na **Tabela 2.3**.

**Tabela 2.3.** Descrição dos componentes usados na mix para a PCR

| Componentes da “Mix”               | Volume (µl) |
|------------------------------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O autoclavada       | 18,05       |
| Buffer (10x)                       | 2,5         |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM)           | 1,0         |
| DNTP’S (100 mM)                    | 0,25        |
| <i>Primer Foward</i> (5U)          | 0,5         |
| <i>Primer Reverse</i> (5U)         | 0,5         |
| Taq polimerase ( <i>Bioline</i> ®) | 0,2         |
| <i>Template</i> (2 µl de DNA)      | 2,0         |

Utilizou-se um termociclador (*Mycycler BioRad*®) (**Fig.2.7**) programado com as condições descritas no protocolo utilizado (**Tabela 2.4**).

**Figura 2.7.** Execução da PCR no termociclador utilizado para amplificação de DNA leptospírico (*foto original da autora*)

**Tabela 2.4.** Descrição das condições de amplificação do DNA leptospírico.

| Fases de amplificação | Temperatura | Tempo  | Ciclos |
|-----------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturação inicial  | 94°C        | 5 min  | 45x    |
| Desnaturação          | 94°C        | 15seg  |        |
| Emparelhamento        | 56°C        | 35 seg |        |
| Extensão              | 72°C        | 40 seg |        |
| Extensão final        | 72°C        | 10 min | 1x     |

Para assegurar a eficiência do teste e a fiabilidade dos resultados, utilizou-se DNA extraído de culturas de alguns serovares de *L. interrogans* que foram usadas como controlo positivo e a água autoclavada como controlo negativo.

### 2.3.3. Visualização dos produtos amplificados/ DNA de *Leptospira* spp.

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por electroforese em gel de agarose a 2%, corado com *red safe*<sup>®</sup>. Foi aplicada uma corrente eléctrica de 120 volts durante 45 minutos conforme recomendado pelo protocolo.

Procedimento: preparou-se o gel por dissolução de 2,0 gramas de agarose pura (Bioline<sup>®</sup>), em 100 ml de tampão TAE 1x (0,04 M Tris-HCl; pH 8,0; 0,002 EDTA; 0,02 Molares de acetato de sódio) Sigma-Aldrech<sup>®</sup>, ao qual se adicionaram 2µl de *red safe*<sup>®</sup>. Após a polimerização, o gel foi colocado na tina de electroforese com o tampão, TAE 1x; aplicou-se no gel um volume de 6µl do produto de PCR, de cada amostra, incluindo os controlos (negativo e positivo) aos quais foram adicionados previamente 2µl de *loading buffer* Bioline<sup>®</sup>. Foi usado um marcador de DNA de 100 pares de bases (pb) BioRad<sup>®</sup>, para identificação, e comparação da dimensão do(s) fragmento(s) amplificado(s). Estes foram comparados com os controlos positivo e negativo <sup>(27)</sup>.

**Tampão TAE (10 X):** utilizado como solução “stock” para preparar o tampão de corrida na electroforese em gel de agarose, que também se usou para dissolver os reagentes já referidos, e diluído para a concentração de 1x TAE.

**Loading buffer:** utilizado na preparação das amostras a aplicar em gel de agarose. Esta solução facilita também a sua aplicação, minimizando a possibilidade de danificar os poços e estabilizando o DNA dentro dos mesmos <sup>(44)</sup>.

No gel, os produtos da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), cuja captura de imagem e análise foi feita num equipamento *Dolphin 1D gel Ima. Analisis Software* (Wealtec<sup>®</sup>) próprio para o efeito.

#### **2.3.4. Sequenciação do produto amplificado (DNA)**

As amostras amplificadas consideradas positivas na PCR foram enviadas à empresa *Stabvida*<sup>®</sup> (Portugal) para sequenciação a fim de se identificar a(s) espécie(s) de *Leptospira* e respectivos serovares presente(s) nas mesmas, através da comparação por “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) com sequências depositadas no *GenBank*<sup>®</sup> para determinação da homologia entre elas.

#### **2.4. Análise e tratamento de dados**

Foi construída uma base de dados informática no programa *Access 2000, Microsoft*<sup>®</sup> com dados clínicos-epidemiológicos da população alvo do estudo, recolhidos nos inquéritos, permitindo assim a escolha dos testes laboratoriais a realizar posteriormente e o respectivo tratamento estatístico, tendo sido utilizado o programa *Primer* of biostatistic, version 3.02 de Mc Graw-Hill.

Foi calculado o Risco Relativo (RR), que é uma medida de efeito, com base na razão da ocorrência de determinada doença, que estabelece uma indicação de quantas vezes maior é o risco dessa ocorrer entre a população exposta, comparativamente à população não exposta a um determinado factor de risco. É definida como a razão

entre a incidência da doença no grupo dos expostos ( $I_e$ ) e a incidência no grupo dos não expostos ( $I_{ne}$ ) de acordo com a seguinte descrição:

|              | Doentes | Não doentes |
|--------------|---------|-------------|
| Expostos     | a       | b           |
| Não expostos | c       | d           |

$$RR = \frac{I_e}{I_{ne}} = \frac{c/(cd)}{a/(ab)}$$

Usou-se também o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para comparar variáveis qualitativas, adoptando-se o nível de significância de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Para a determinação da concordância entre os diversos testes laboratoriais foi aplicado o teste estatístico “kappa” ( $K$ ), referido por Garcia <sup>(42)</sup>. Este teste é uma medida decimal que evidencia a concordância existente entre dois testes distintos, cuja fórmula se apresenta abaixo.

|                       |          | Teste de referência |          |
|-----------------------|----------|---------------------|----------|
|                       |          | Positivo            | Negativo |
| Teste em<br>Avaliação | Positivo | a                   | b        |
|                       | Negativo | c                   | d        |

a – verdadeiros positivos; b – falsos positivos

c – falsos negativos; d – verdadeiros negativos

$$K = (a+d - P) / (1 - P) \text{ em que } P = (a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)$$

Um valor igual ou superior a 0,81 corresponde a uma concordância favorável entre o(s) teste(s) em avaliação.



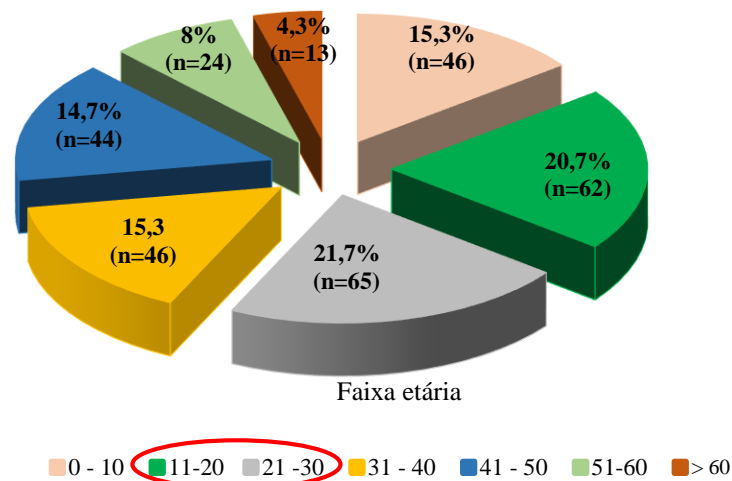
### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1. População alvo

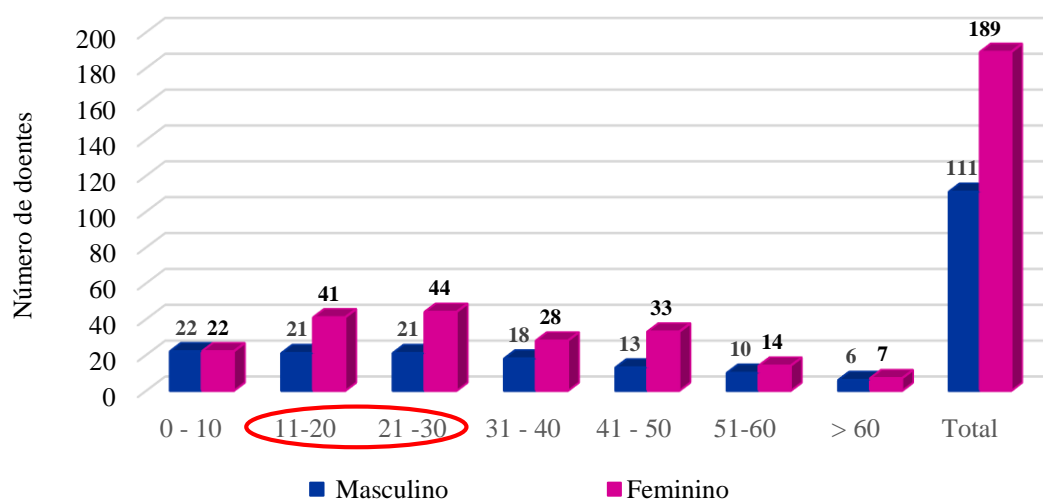
##### 3.1.1. Caracterização da população estudada (amostras)

Para o rastreio serológico e molecular proposto no presente trabalho foram obtidas (N=300) amostras séricas, de uma população heterogénea constituída por homens, mulheres e crianças, tendo a variável ‘idade’ sido distribuída por faixas etárias (**Fig. 3.1.A**), para a caracterização da população na área de estudo.



**Figura 3.1.A** Representação gráfica da distribuição da população estudada [(doentes); N=300] por faixa etária

Da análise da presente distribuição por idade, ressalta uma distribuição bastante homogénea dos doentes, sendo as faixas correspondentes à idade activa (21 – 60 anos) representativas, no seu conjunto, de mais de metade do total da amostra (155; 51,6%) (**Fig. 3.1.A**). As crianças e jovens (0 aos 20 anos) corresponderam a 108 doentes (36%) da amostra. No que respeita ao género, foi o feminino que apresentou a maior frequência (63%) (**Fig. 3.1.B**).



**Figura 3.1. B** Representação gráfica da distribuição de doentes (N=300) de acordo com a faixa etária *versus* gênero.

### 3.1.2. Aspectos epidemiológicos quanto ao tipo de risco de exposição à infecção

Relativamente aos aspectos considerados de risco de infecção por leptospiros, foram analisados os seguintes parâmetros: *i*) área de proveniência/residência; *ii*) ocupação profissional; *iii*) contacto com roedores ou potenciais hospedeiros; *iv*) contacto/consumo de água não tratada, viagens e outras situações; e *v*) existência/ausência de saneamento básico.

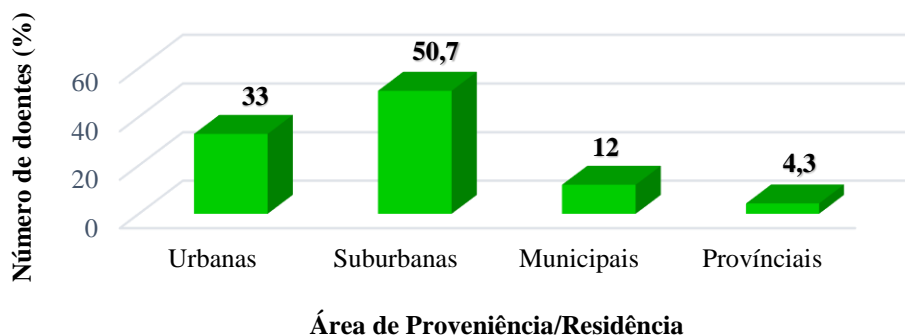
#### *i*) Área de proveniência/residência

Para uma melhor avaliação dos resultados na população estudada, de acordo com a proveniência/residência face ao risco de infecção por *Leptospira* spp. os doentes foram integrados em três grupos:

- ❖ Doentes provenientes ou residentes dentro da cidade do Lubango (área urbana e suburbana);
- ❖ Doentes provenientes de alguns municípios da província de Huíla;
- ❖ Doentes provenientes de outras províncias do país.

Em relação à área de proveniência/residência dos doentes que integraram o estudo (N=300), verificou-se que a área suburbana foi a mais representada com (n=152;

50,7%) do total de doentes (**Fig. 3.2.**). Ainda no mesmo gráfico verificou-se que (n=36; 12%) dos doentes foram oriundos de outros municípios e (4,3%) vieram de outras províncias do país (Angola).



**Figura 3.2.** Representação gráfica da distribuição de doentes (%), segundo a proveniência/ residência.

### **ii) Ocupação profissional**

Em relação à variável ‘profissão/ocupação’ dos doentes em estudo, com base nos dados recolhidos nos inquéritos, verificou-se que a indicação de doméstica, camponesa e estudante foram as mais representadas no conjunto dos inquiridos (**Tabela 3.1.**).

### **iii) Contacto com roedores e/ou potenciais hospedeiros**

Dos dados obtidos dos inquéritos (N=300) sobre o ‘contacto com os animais reservatórios/hospedeiros, observou-se que 90,7% da população teve contacto com os roedores, seguidos dos canídeos, com 25% (**Tabela 3.2.**).

**Tabela 3.1.** Distribuição da população em estudo (N=300) por profissão/ocupação.

| <b>Profissão/ocupação</b> | <b>n</b> | <b>%</b> |
|---------------------------|----------|----------|
| Camponês (a)              | 44       | 14,7     |
| Desempregado (a)          | 20       | 6,7      |
| Doméstica                 | 56       | 18,7     |
| Estudante                 | 40       | 13,3     |
| Professor                 | 30       | 10,0     |
| Vendedor                  | 22       | 7,3      |
| Empregada de limpeza      | 14       | 4,7      |
| Pastor de animais         | 10       | 3,3      |
| Criador de gado           | 13       | 4,3      |
| Veterinário               | 13       | 4,3      |
| Motorista                 | 11       | 3,7      |
| Outros                    | 12       | 4,0      |
| Não Indicado              | 15       | 5,0      |
| Total                     | 300      | 100,0    |

**Tabela 3.2.** Distribuição de doentes em relação ao contacto com roedores e/ou potenciais hospedeiros/reservatórios.

| <b>Potenciais reservatórios/hospedeiros</b> | <b>n</b> | <b>%</b> |
|---|----------|----------|
| Roedores                                    | 272      | 90,7     |
| Bovinos                                     | 31       | 10,3     |
| Canídeos                                    | 75       | 25       |
| Caprinos                                    | 25       | 8,3      |
| Suínos                                      | 14       | 4,7      |
| Outros                                      | 8        | 2,6      |
| Sem contactos                               | 20       | 6,0      |

**iv) Contacto/Consumo de água não tratada, viagens e outras situações**

A **Tabela 3.3.** mostra os dados de algumas (potenciais) situações de risco de infecção por *Leptospira* spp., tendo-se observado que o consumo de água não tratada (47,7%) e o contacto directo com águas paradas ou solo húmido (54,7%) foram as situações de risco com maior ocorrência.

**Tabela 3.3.** Distribuição de doentes de acordo com as variáveis ‘contacto/consumo de água não tratada’, ‘viagens’ e ‘outras situações’.

| Situações de potencial risco face a leptospiros      | n   | %    |
|--|-----|------|
| Consumo de água não tratada                          | 143 | 47,7 |
| Contacto directo com águas paradas ou solo húmido    | 164 | 54,7 |
| Contacto com água do rio (nadar no rio/riacho-lazer) | 64  | 23,3 |
| Realização de viagens                                | 126 | 42,0 |

**v) Condições ambientais e saneamento básico nas áreas residenciais dos doentes**

Dos inquéritos realizados (N=300) foram também incluídas variáveis como as ‘condições ambientais’ e a ‘presença/ausência de saneamento básico’. Dos dados obtidos dos inquéritos foi possível observar que 153 (51%) dos respondentes foram afectados por enchentes (inundações) nas suas residências na época das chuvas (**Tabela 3.4.**).

Em relação às condições ambientais e de saneamento básico nas áreas de residência, ‘os destinos de lixos ar livre’, ‘águas residuais’ e ‘aprovisionamento de alimentos’, 48,3%, 28%, e 54% respectivamente, dos inquiridos, mostraram práticas e atitudes incorrectas, como está representado também na **Tabela 3.4. e Fig. 3.3.**



**Figura 3.3.** Imagem sobre os destinos residuais (numa área suburbana da cidade (Lubango) (fotos originais da autora).

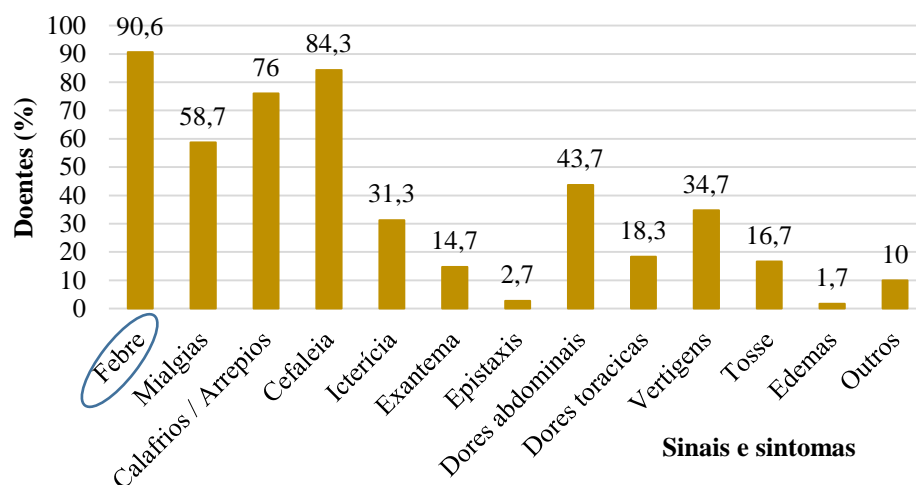
**Tabela 3.4.** Distribuição dos doentes estudados de acordo com ‘as condições ambientais’ e de ‘saneamento básico’ nas áreas de residência dos doentes.

|          | Condições   | n   | %    |
|----------|---|-----|------|
| <b>1</b> | <b>Enchentes (inundações) por chuvas nas áreas residenciais</b> |     |      |
| 1.1      | Sim   | 153 | 51   |
| 1.2      | Não   | 140 | 46,7 |
| 1.3      | Outros  | 7   | 2,3  |
| <b>2</b> | <b>Destino ou depósitos de lixo:</b>                            |     |      |
| 2.1      | Ar livre  | 145 | 48,3 |
| 2.2      | Contentores   | 100 | 33,3 |
| 2.3      | Vala ou buraco  | 15  | 15   |
| 2.4      | Outros  | 40  | 13,3 |
| <b>3</b> | <b>Destino de águas residuais:</b>                              |     |      |
| 3.1      | Esgotos   | 95  | 31,6 |
| 3.2      | Vala  | 65  | 21,6 |
| 3.3      | Ar livre  | 84  | 28   |
| 3.3      | Outras situações (riachos, não identificado)                    | 56  | 18,7 |
| <b>4</b> | <b>Saneamento básico nas habitações:</b>                        |     |      |
| 4.1      | Casa de Banho   | 231 | 76,6 |
| 4.2      | Latrina de fossa seca   | 30  | 10   |
| 4.3      | Outras situações  | 47  | 15,7 |
| <b>5</b> | <b>Aprovisionamento de alimentos nas residências:</b>           |     |      |
| 5.1      | Despensa  | 143 | 47,6 |
| 5.2      | Geleira (Frigorífico)   | 165 | 55   |
| 5.3      | Outras situações (mesa, fogão....)                              | 162 | 54   |

### 3.1.3. Manifestações Clínicas (sinais e sintomas)

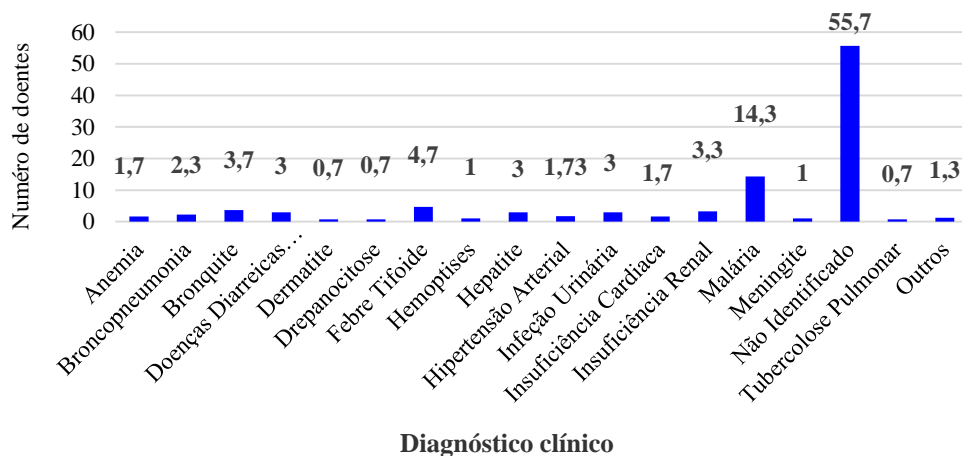
Através dos inquéritos, foi também analisada a informação respeitante às manifestações clínicas dos doentes. Foi possível coligir os principais sinais e sintomas, tais como febre, cefaleias e mialgias, entre outros (**Fig. 3.4.**), referidos pelos doentes. Registou-se também o diagnóstico clínico dos doentes internados (**Fig. 3.5.**).

Da análise desta informação, observou-se que a febre esteve presente numa grande parte dos doentes inquiridos (90,6%), seguindo-se as cefaleias (84,3%), os calafrios (76%) e as mialgias (58,7%); epistaxis e edemas foram as queixas menos referidas.



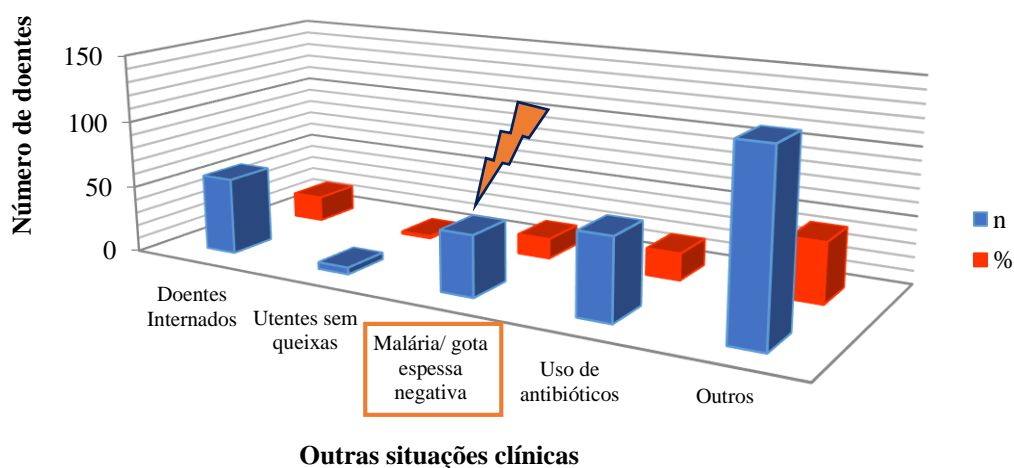
**Figura 3.4.** Representação gráfica da distribuição (%) dos doentes inquiridos de acordo com as principais manifestações clínicas (sinais e sintomas).

Da avaliação dos dados obtidos nos processos clínicos (diagnóstico clínico) dos doentes internados, verificou-se que a malária, febre tifóide, bronquite, insuficiência renal e a hepatite foram os principais diagnósticos com uma frequência entre os 14,3%; 4,7%; e os 3%. De salientar, o número elevado de doentes (55,7%) que na altura do estudo, não tinham (ainda) indicação de diagnóstico (**Fig. 3.5.**).



**Figura 3.5.** Representação gráfica da distribuição de doentes *versus* diagnóstico clínico.

Na **Fig. 3.6.** foram analisados dados (N=300) sobre alguns outros aspectos, tais como: internamentos, utentes sem queixas (assintomáticos), diagnóstico clínico de malária (com gota espessa negativa) e doentes que já estavam a tomar antibióticos. Da análise efectuada, verificou-se que 57 (19%) corresponderam a doentes internados; 5 (1,7%) eram utentes sem queixas sintomáticas e 45 (15%) tinham como diagnóstico clínico malária, mas com resultado de gota espessa negativa; e 60 (20%) de doentes já estavam a tomar antibiótico à data em que participaram no estudo (**Fig. 3.6.**).



**Figura 3.6.** Representação gráfica da distribuição de doentes de acordo com outras situações clínicas.

## **3.2. Testes Serológicos**

Na abordagem serológica dos doentes que constituíram o presente estudo (N=300) foram realizados os testes MACROLepto, SD Bioline *Leptospira* IgM/IgG (Kit comercial) e TAM.

### **3.2.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto)**

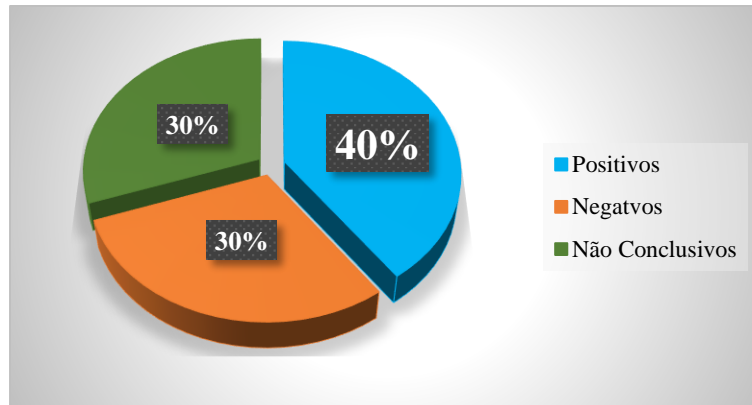
Pela técnica MACROLepto foram analisadas todas as amostras séricas (N=300), tendo-se obtido 70 (23%) soros com resultado positivo e 111 (37%) com resultado não conclusivo (**Tabela 3.5**).

### **3.2.2. Kit (SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG)**

Pelo Kit (SD Bioline *Leptospira* IgM/ IgG) foram analisadas apenas 75 do total das amostras, as quais, na sua totalidade, mostraram resultado negativo. No entanto, as referidas amostras foram avaliadas pelo teste MACROLepto, revelaram 18 (24%) com resultado positivo e 26 (35%) foram consideradas como ‘não conclusivas’.

### **3.2.3. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)**

Do total de amostras (N=300) de soro submetidas a TAM, obteve-se um resultado positivo em 120 (40%), e em 91 (30%) das amostras, o resultado foi ‘não conclusivo’ (**Tabela 3.7**).



**Figura 3.7.** Distribuição dos resultados obtidos pela TAM no total de amostras (N=300).

A TAM, também permitiu conhecer os serogrupos mais reactivos. Assim, nas já referidas 120 amostras com resultado positivo, isto é, com presença de anticorpos anti-L. *Interrogans* (s.l.) destacaram-se os seguintes serogrupos/serovares: Icterohaemorrhagiae (Copenhageni), Australis (Bratislava), Javanica (Poi) e Hebdomadis (Hebdomadis), com 24,2%, 16,6% e os dois últimos com 8,3% respectivamente.

O título de anticorpos mais elevado foi de 1:800, observado para os serovares: Copenhageni, Arborea, Panama e Pyrogenes (**Tabela 3.5.**).

De referir também, que em 23,3% das amostras foi observada a reactividade contra um único serovar.

**Tabela 3.5.** Distribuição de serogrupos reactivos na TAM *versus* títulos obtidos.

| Serogrupos (Serovares)                    | Títulos de anticorpos |     |     |     |     | Total | % |
|---|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-------|---|
|   | 100                   | 200 | 400 | 800 |     |       |   |
| Australis (Bratislava)                    | 8                     | 9   | 3   | -   | 20  | 16,6  |   |
| Autumnalis (Autumnalis)                   | 1                     | 2   | -   | -   | 3   | 2,5   |   |
| Ballum (Arborea)                          | 5                     | 4   | -   | 1   | 10  | 8,3   |   |
| Bataviae (Bataviae)                       | 4                     | 1   | -   | -   | 5   | 4,2   |   |
| Canicola (Canicola)                       | 2                     | 1   | -   | -   | 3   | 2,5   |   |
| Cynopteri (Cynopteri)                     | -                     | 2   | -   | -   | 2   | 1,7   |   |
| Grippytyphosa (Grippytyphosa)             | 4                     | 1   | 1   | -   | 6   | 5,0   |   |
| Sejroe (Hardjobovis)                      | 3                     | 2   | 1   | -   | 6   | 5,0   |   |
| Sejroe (Hardjoprajitno)                   | 1                     | 3   | -   | -   | 4   | 3,3   |   |
| Hebdomadis (Hebdomadis)                   | 3                     | 4   | 1   | -   | 8   | 6,7   |   |
| Icterohaemorrhagiae (Copenhageni)         | 14                    | 12  | 1   | 2   | 29  | 24,2  |   |
| Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) | 4                     | -   | 1   | -   | 5   | 4,2   |   |
| Mini (Mini)                               | 1                     | -   | -   | -   | 1   | 1,7   |   |
| Panama (Panama)                           | 2                     | -   | -   | 1   | 3   | 2,5   |   |
| Javanica (Poi)                            | 5                     | 2   | 1   | -   | 8   | 6,7   |   |
| Pomona (Pomona)                           | 1                     | -   | 1   | -   | 2   | 1,7   |   |
| Pyrogenes (Pyrogenes)                     | -                     | -   | -   | 1   | 1   | 0,8   |   |
| Sejroe (Wolffi)                           | 2                     | 2   | -   | -   | 4   | 3,3   |   |
| Total                                     | 60                    | 45  | 10  | 5   | 120 | 100,0 |   |

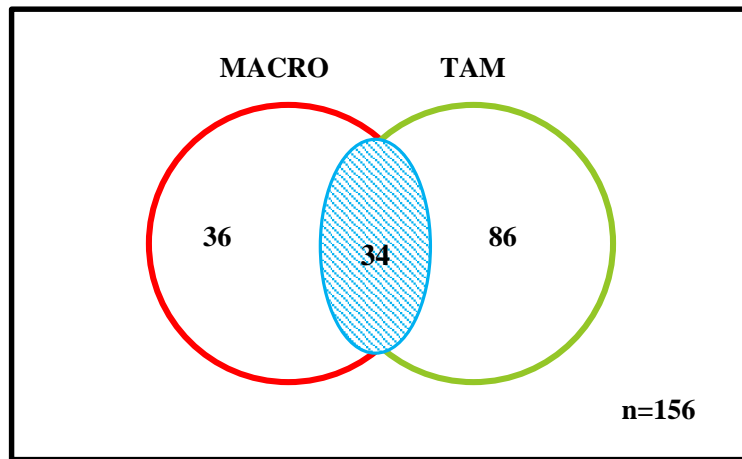
#### ❖ Avaliação dos resultados obtidos pelas duas técnicas serológicas (MACROLepto e TAM)

Os resultados obtidos pelas duas técnicas acima referidas mostraram que a técnica de referência (TAM), permitiu diagnosticar um maior número de amostras do que a técnica MACROLepto (Tabela 3.6).

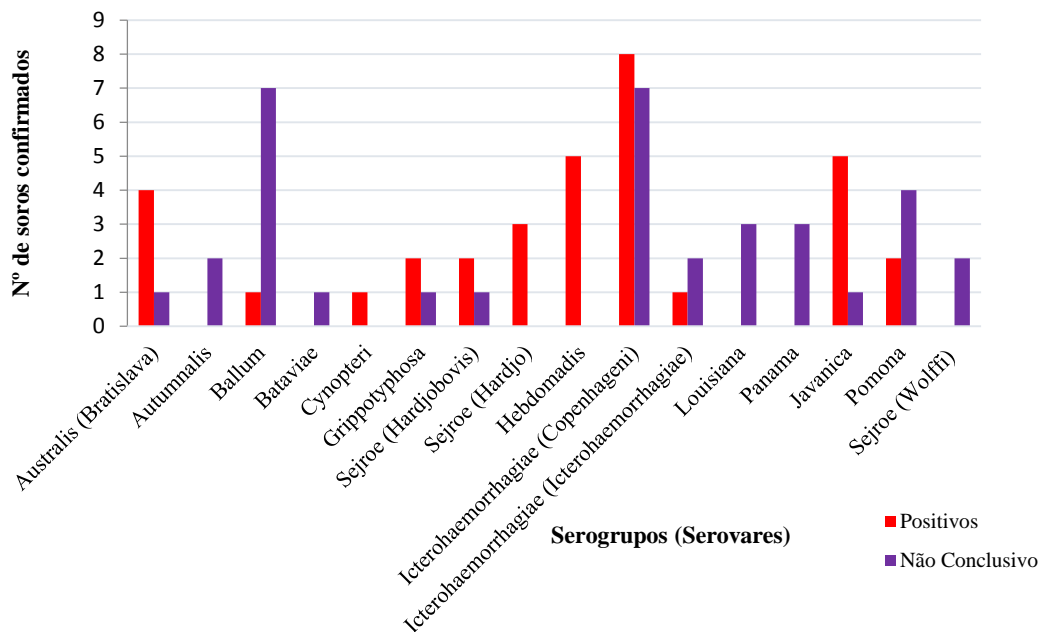
**Tabela 3.6.** Distribuição dos resultados obtidos pelas técnicas MACROLepto e TAM.

| Métodos de diagnóstico | Positivo | %    | Negativo | %    | Não Conclusivo | %    | Total |
|------------------------|----------|------|----------|------|----------------|------|-------|
| MACROLepto             | 70       | 23,0 | 119      | 40,0 | 111            | 37,0 | 300   |
| TAM                    | 120      | 40,0 | 89       | 29,6 | 91             | 30,3 | 300   |

Os resultados mostram que 34 (21,8%) do total de amostras analisadas foram positivas pelas duas técnicas, como demonstrado na **Fig. 3.8**. Os serogrupos que se revelaram como os mais reactivos, por ambas as técnicas, estão representados na **Fig. 3.9**.



**Figura 3.8.** Representação esquemática dos resultados positivos pela MACROLepto e confirmados pela TAM.



**Figura 3.9.** Distribuição dos resultados positivos e não conclusivos confirmados pela TAM e respectivos serogrupos (serovares).

Da observação dos resultados obtidos por estas duas técnicas foi possível também verificar que 42 amostras (n=119) revelaram a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* com resultado inicial negativo pela MACROLepto, e das 111 amostras com resultado não conclusivo pela mesma técnica, 44 revelaram pela TAM, presença de anticorpos contra *L. interrogans*.

A interpretação dos resultados pelas duas técnicas face aos dados obtidos nos inquéritos aos doentes (**Tabela 3.7.**), evidenciou que os resultados confirmados pela TAM (n =34) corresponderam, na sua maioria, ao género feminino, que foi o mais representado com 21 casos (61,3%), correspondendo às faixas etárias dos 11-20 e dos 21-30 anos de idade com 7 a 9 casos (20,6 a 26,5%), tendo sido os grupos etários mais afectados.

Quanto à 'profissão/ocupação' destacaram-se as camponesas com 23,5%, seguindo-se os estudantes com 20,6%. No que diz respeito às áreas de residência, a área suburbana foi a proveniência mais associada aos doentes com resultado positivo na avaliação serológica, com 15 casos (44,1%).

Em relação a variável 'contacto com roedores' e/ou 'potenciais hospedeiros/reservatórios' observou-se que a maioria (97%) dos doentes teve contacto directo com roedores, seguidos dos canídeos com 14 (41,17%). Ainda na mesma tabela, observam-se os resultados relativos ao 'consumo/contacto de água não tratada' em 27 doentes (79,4%).

No que respeita às restantes variáveis incluídas nos inquéritos (condições de saneamento básico nas residências dos doentes), das 34 amostras com resultado positivo pela MACROLepto e TAM observou-se que a maioria tem práticas e atitudes incorrectas, conforme dados apresentados no **Anexo VII**.

**Tabela 3.7.** Caracterização das 34 amostras POS na MACROLepto e TAM *versus* dados epidemiológicos.

| <b>Dados epidemiológicos</b>  | <b>N</b> | <b>%</b> |
|---|----------|----------|
| <b>Género</b>   |          |          |
| Masculino   | 13       | 37,9     |
| Feminino  | 21       | 61,3     |
| <b>Idade</b>  |          |          |
| 0-10  | 5        | 14,7     |
| 11-20   | 7        | 20,6     |
| 21-30   | 9        | 26,5     |
| 31-40   | 6        | 17,6     |
| 41-50   | 3        | 8,8      |
| 51-60   | 3        | 8,8      |
| >60 anos  | 2        | 6,0      |
| <b>Profissão/ ocupação</b>  |          |          |
| Camponesa   | 8        | 23,5     |
| Empregada de limpeza pública  | 2        | 5,8      |
| Pedreiro  | 2        | 5,8      |
| Pastor/criador de animais   | 3        | 8,8      |
| Professor   | 4        | 11,8     |
| Estudante   | 7        | 20,6     |
| Vendedores  | 3        | 8,8      |
| Doméstico   | 4        | 11,8     |
| <b>Proveniência/ residência</b>   |          |          |
| Urbanas   | 14       | 41,1     |
| Suburbanas  | 15       | 44,1     |
| Províncias  | 3        | 6,0      |
| Municípios  | 2        | 8,8      |
| <b>Contacto com roedores e/ou potenciais hospedeiros</b>                    |          |          |
| Roedores  | 33       | 97,0     |
| Bovinos   | 7        | 20,6     |
| Caprinos  | 4        | 11,8     |
| Suínos  | 4        | 11,8     |
| Canídeos  | 14       | 41,2     |
| <b>Contacto/consumo de água não tratada, solo húmido e outras situações</b> |          |          |
| Consumo de água não tratada   | 27       | 79,4     |
| Contacto direto com águas paradas/ ou solo húmido                           | 12       | 35,0     |
| Contacto com água dos rios (nadar)  | 12       | 35,0     |
| Realização de viagens ...   | 16       | 47,1     |

**Tabela 3. 8.** Caracterização de soros com resultados confirmados pela TAM em relação aos principais sinais e sintomas, diagnóstico clínico e outras situações clínicas.

| <b>Sinais e sintomas</b>                         | <b>n</b> | <b>%</b> |
|--|----------|----------|
| Febre  | 32       | 94,1     |
| Calafrios  | 24       | 70,5     |
| Cefaleias  | 28       | 82,3     |
| Mialgias   | 18       | 52,9     |
| Icterícia  | 8        | 23,5     |
| Exantemas  | 6        | 17,6     |
| Dores abdominais                                 | 7        | 20,5     |
| Dores torácicas                                  | 4        | 11,7     |
| Edemas   | 2        | 5,8      |
| Vômitos  | 2        | 5,8      |
| Dispneia   | 2        | 5,8      |
| Vertigens  | 2        | 5,8      |
| Tosse  | 5        | 14,7     |
| <b>Diagnóstico clínico</b>                       |          |          |
| Malária complicada                               | 10       | 29,4     |
| Pneumonia  | 2        | 5,8      |
| Hepatite   | 3        | 8,8      |
| Anemia   | 1        | 2,9      |
| Meningite  | 1        | 2,9      |
| Insuficiência renal                              | 3        | 8,8      |
| Insuficiência cardíaca                           | 1        | 2,9      |
| Febre tifóide                                    | 2        | 5,8      |
| Outros   | 6        | 17,6     |
| <b>Outras situações</b>                          |          |          |
| Doentes internados                               | 6        | 17,5     |
| Utentes/sem queixas                              | 1        | 2,9      |
| Diagnóstico de malária com gota espessa negativa | 7        | 20,5     |
| Doentes com o uso de antibiótico                 | 2        | 5,8      |

Da análise feita às 34 amostras cujo resultado foi confirmado pela TAM em relação aos sinais e sintomas, diagnóstico clínico, e outras situações clínicas, a febre foi a síndrome mais frequente, tendo sido verificada em 94,1% dos doentes. Quanto ao diagnóstico clínico, o maior predomínio foi para a malária complicada, em 29,4% dos doentes,

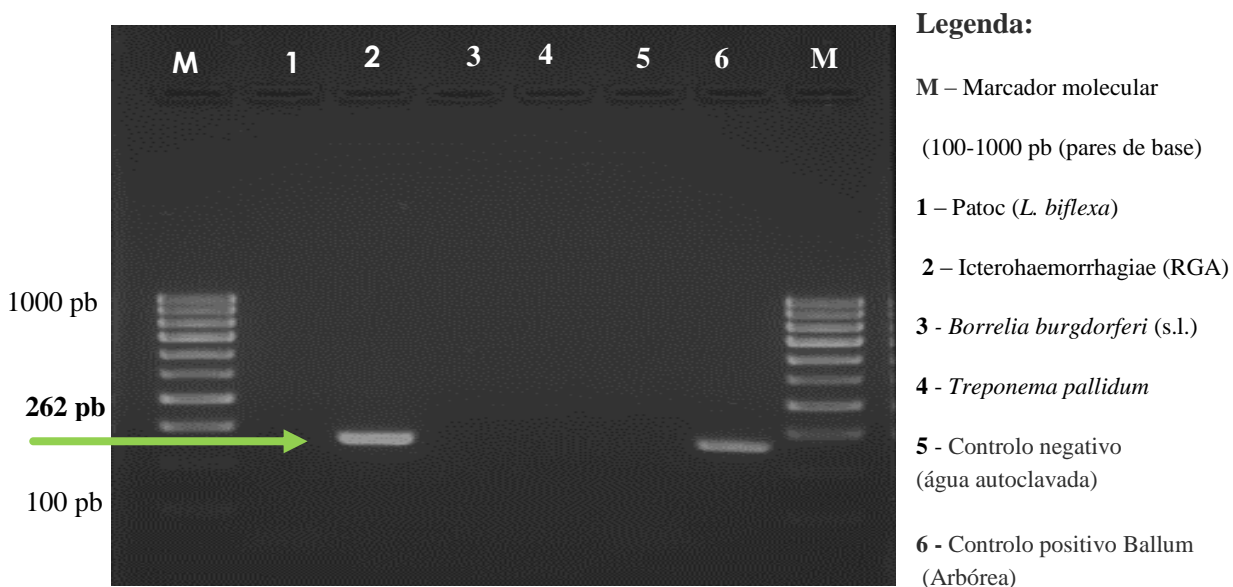
seguindo-se, hepatite e insuficiência renal com 8,8% e a pneumonia com 5,8% (Tabela 3.8.). Foi também verificado que sete doentes tinham diagnóstico de malária, mas o teste da gota espessa foi negativo. Observou-se também um utente (sem queixas) com resultado positivo para TAM.

### 3.3. Testes moleculares

#### 3.3.1. Teste de especificidade e sensibilidade dos *primers* hap1

##### ❖ Teste de especificidade

Na Fig. 3.10 verificou-se que os *primers* hap1 são específicos para *L. interrogans*, uma vez que não se observa a amplificação de DNA de outras espiroquetas tais como: *Borrelia burgdorferi* (s.l.) e *Treponema pallidum*, bem como de leptospiros *saprófitas* [Patoc (*L. biflexa*)]. Observou-se sim, a amplificação de DNA de leptospiros patogénicas representantes dos serogrupos (estirpes) Icterohaemorrhagiae (RGA) e Ballum (Arborea).

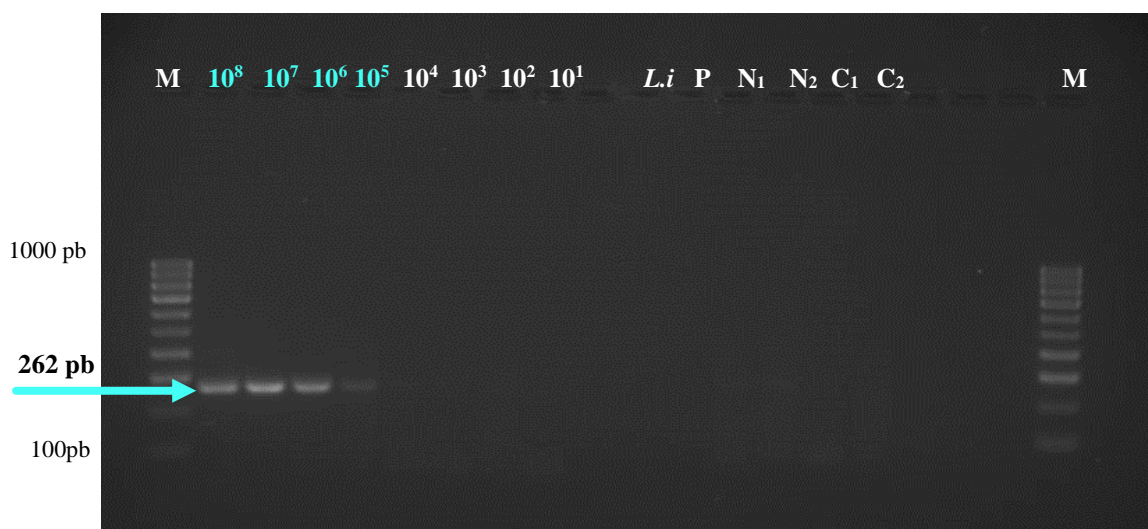


**Figura 3.10.** Resultado do teste de especificidade com os *primers* hap1 (262 pb) de serogrupos patogénicos de *L. interrogans*.

### ❖ Teste de sensibilidade

Relativamente à sensibilidade da PCR, foi amplificado DNA de diluições seriadas de cultura de leptospiras da estirpe RGA (*Icterohaemorrhagiae*), entre outras, partindo de uma cultura com uma densidade de  $10^8$  bactérias/ml.

A amplificação correspondeu a um fragmento de 262 pb (pares de base) como mostra a **Fig. 3.11**, podendo-se observar detecção de DNA até à diluição  $10^5$  bactérias/ml.



**Figura 3.11.** Resultado do teste de sensibilidade da PCR com *primers* hap1 (262pb) em diluições seriadas de culturas do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (RGA). **Legenda:** M - Marcador molecular (100 -1000 pb); ( $10^8$ - $10^1$ ) - diluições de RGA ( $10^8$ -10 bactérias/ml); *L. i* - *L. inadai*; P - Patoc; C.ex<sub>1,2</sub> - controlo negativo da extracção de DNA; CN<sub>1,2</sub> - controlo negativo do PCR (água autoclavada).

### 3.3.2. Amplificação de DNA de soros por PCR com os *primers* hap1

A aplicação do protocolo de PCR (*primers* hap1) às amostras de soro dos doentes, resultou na amplificação de um fragmento de DNA de 262 pb (**Fig. 3.12**), tendo este sido observado em 30<sup>+</sup>/193 (**Tabela 3.9**).



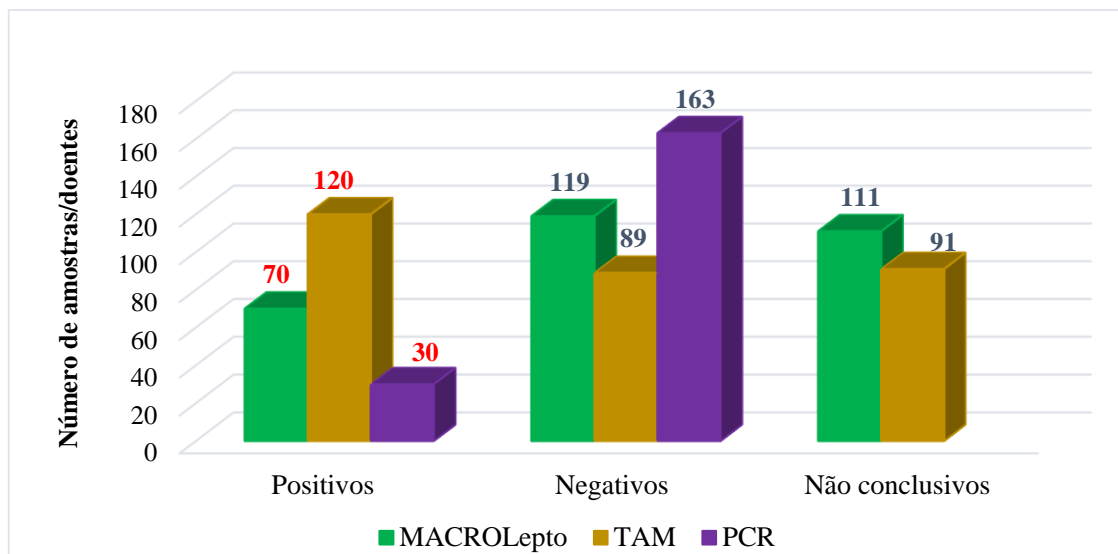
**Figura 3.12.** Resultados de algumas amostras de soro (dos doentes) amplificadas pela PCR com *primers* hap1. **Legenda:** M - Marcador molecular (100-1000 pb); A - Amostras; C.ex<sub>1,2</sub> - Controlo negativo da extracção de DNA; CN<sub>1,2</sub> - Controlo negativo da PCR; C<sup>+</sup> - Controlo positivo (Ballum Arborea - 10<sup>8</sup> bactérias/ml).

**Tabela 3.9.** Distribuição das amostras analisadas por PCR (fase aguda de evolução da doença e NEG na TAM) utilizando os *primers* hap1.

| Amostras (n=193)                  | PCR       |             |          |      |
|-----------------------------------|-----------|-------------|----------|------|
|                                   | Positivo  | %           | Negativo | %    |
| 121<br>(Dias de evolução ≥1 e <7) | 25        | 13,0        | 96       | 49,7 |
| 72<br>(Negativo pela TAM)         | 5         | 3,0         | 67       | 35,0 |
| Total                             | <b>30</b> | <b>15,5</b> | 163      | 84,5 |

❖ **Análise comparativa dos resultados da PCR versus métodos serológicos**

A **Fig. 3.13** mostra os diferentes resultados obtidos pelas três técnicas utilizadas. De referir, no entanto, que do total de amostras estudadas, seis (3%), revelaram resultado positivo nas três abordagens efectuadas (MACROLepto, TAM e PCR) como se pode verificar na **Fig. 3.14**.

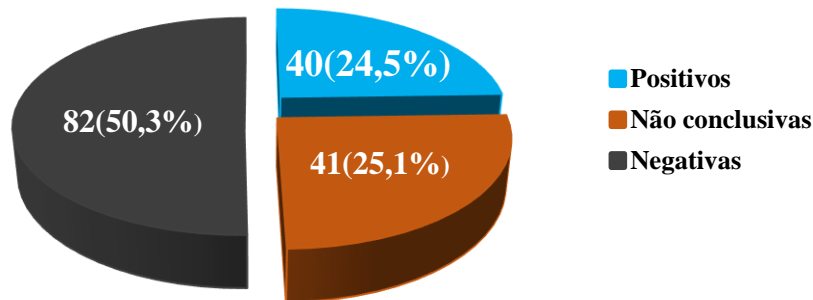


**Figura 3.13.** Representação gráfica dos resultados obtidos pelas três técnicas realizadas (MACROLepto, TAM, PCR).



**Figura 3.14.** Representação gráfica das amostras com resultado positivo pelas três técnicas utilizadas (MACROLepto, TAM e PCR)

Por sua vez, das 163 amostras que se mostraram negativas pela PCR, 40 (24,5%) foram positivas pela TAM (**Fig. 3.15**).



**Figura 3.15.** Representação gráfica de amostras com resultado negativo pela PCR e positivo pela TAM.

### 3.3.3. Sequenciação de produtos amplificados (DNA)

Os produtos amplificados com os *primers* hap1 (30 amostras de soro) foram sequenciados, o que permitiu a identificação de espécies genéticas e serovares de *Leptospira*. Assim, a espécie *L. borgpetersenii* foi identificada em 14 amostras, *L. interrogans* foi identificada em 11 amostras e a espécie *L. kirschneri* em duas amostras, tendo apresentado uma homologia de 86 a 100%. As respectivas sequências estão representadas na **Fig. 3.16. (Anexo VIII)**.

No que respeita aos serogrupos/serovares correspondentes às referidas espécies genómicas, estes foram identificados como sendo Hardjobovis, Lai, Javanica, (*L. interrogans*) Balico, Javanica (*L. borgpetersenii*) e Pomona (*L. kirschneri*).

### 3.4. Tratamento estatístico

#### ❖ Dados epidemiológicos e risco de exposição à infecção por *Leptospira* spp.

O tratamento estatístico de alguns dados epidemiológicos, mostrou que os mesmos não influenciaram os resultados obtidos tanto pela TAM como pela PCR, já que não foram observadas diferenças com significado estatístico nas diferentes associações (**Tabela 3.10**). No entanto, observou-se, que os ‘casos’ laboratorialmente diagnosticados quer pela abordagem serológica, quer pela molecular, que o risco relativo (RR) da população alvo, poder contrair Leptospirose, esteve directamente associado a variáveis como o ‘contacto com águas paradas e/ou solo húmido’, sendo o esse risco de valor 2. Assim como, os resultados positivos pela abordagem serológica apresentam um risco relativo de 1,8 quando associados à variável ‘destino/depósitos de lixo ao ar livre’.

**Tabela 3.10.** Principais associações entre as variáveis epidemiológicas e o risco de Leptospirose na população estudada, face aos resultados obtidos por TAM e PCR.

| Aspectos epidemiológicos                    | Observ.* vs POS (TAM) |          |    |       |      | Observ.* vs POS (PCR) |          |    |       |      |
|---|-----------------------|----------|----|-------|------|-----------------------|----------|----|-------|------|
|   | N                     | $\chi^2$ | gl | P     | RR   | n                     | $\chi^2$ | gl | P     | RR   |
| Contacto com roedores                       | 300                   | 0,03     | 2  | 0,866 | 0,95 | 193                   | 0,09     | 1  | 0,760 | 0,98 |
| Contacto com canídeos                       | 300                   | 1,54     | 1  | 0,215 | 0,30 | 193                   | 0,24     | 2  | 0,264 | 0,5  |
| Contacto com águas paradas e/ou solo húmido | 300                   | 0,52     | 1  | 0,470 | 0,95 | 193                   | 2,47     | 1  | 0,116 | 2    |
| Consumo de água não tratada                 | 300                   | 1,74     | 1  | 0,187 | 0,69 | 193                   | 1,74     | 1  | 0,204 | 0,57 |
| Destino/Depósito de lixo ao ar livre        | 300                   | 0,69     | 1  | 0,407 | 1,8  | 193                   | 2,47     | 1  | 0,965 | 1,1  |

\*Observados

Legenda: gl- Grau de liberdade

### ❖ Análise estatística dos dados epidemiológicos quanto às manifestações clínicas e outras situações

**Tabela 3.11.** Principais associações entre as manifestações clínicas e o risco de Leptospirose na população estudada, face aos resultados obtidos por TAM e PCR.

| Manifestações clínicas e outras situações | Observ.* vs POS (TAM) |          |    |        |       | Observ.* vs POS (PCR) |          |    |        |      |
|---|-----------------------|----------|----|--------|-------|-----------------------|----------|----|--------|------|
|   | N                     | $\chi^2$ | gl | P      | RR    | n                     | $\chi^2$ | gl | P      | RR   |
| <b>Icterícia</b>                          | 300                   | 36,64    | 1  | <0,001 | 0,62  | 193                   | 17,300   | 1  | <0,001 | 0,36 |
| <b>Presença da febre</b>                  | 300                   | 0,616    | 1  | 0,432  | 8,591 | 193                   | 0,062    | 1  | 0,804  | 14   |
| <b>Uso de antibiótico</b>                 | 300                   | 0,728    | 1  | 0,394  | 0,227 | 193                   | 2,588    | 1  | 0,108  | 1    |
| <b>Malaria com/GE (-)</b>                 | 300                   | 0,289    | 1  | 0,591  | 0,591 | 193                   | 1,699    | 1  | 0,192  | 0,5  |

\*Observados

Com base na **Tabela 3.11** verifica-se uma associação com grau estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) entre os doentes que apresentavam icterícia e os resultados positivos tanto pela abordagem serológica (TAM), como pela a abordagem molecular (PCR). Observou-se ainda que o risco relativo para os doentes que apresentavam febre é elevado nas duas abordagens realizadas (8,6 e 14).

### ❖ Avaliação de concordância entre técnicas (MACROLepto e TAM)

A análise da concordância entre a Técnica de Rastreio (MACROLepto) e a Técnica de Referência (TAM) através do teste K (kappa) evidenciou um valor de 0,99, o que demonstra uma concordância dos resultados obtidos pelas técnicas efectuadas.

## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

---

Como vem a ser referido ao longo do presente trabalho, a Leptospirose constitui uma preocupação crescente em quase todo mundo, principalmente em regiões endémicas, onde é considerada um problema de grande importância para a Saúde Pública. Como se sabe, para isso contribui o facto de seu diagnóstico ser difícil, sobretudo, por apresentar sintomas não específicos, altamente variáveis e comuns a outras doenças febris <sup>(43)</sup>.

Em Angola (Lubango), a situação epidemiológica da Leptospirose é pouco conhecida. Escassos têm sido os estudos realizados e o diagnóstico laboratorial não é feito, sobretudo por falta de disponibilidade de testes específicos, mesmo de rastreio. A par destas limitações existem ainda as dificuldades de recursos, quer em equipamento quer de profissionais, indispensáveis à realização dos testes laboratoriais de apoio ao respectivo diagnóstico (ex.: técnica de referência, TAM). Portanto, tudo isto contribui para que a Leptospirose seja uma doença sub-diagnosticada, sendo facilmente confundida com outras doenças, o que resulta no desconhecimento da sua prevalência.

Este estudo procurou pois, ser um contributo para um melhor conhecimento desta doença zoonótica na Província da Huila, uma vez que a ocorrência e a prevalência da Leptospirose estão associadas a vários factores de risco, entre eles as condições ambientais, ocupação profissional, saneamento básico, presença de animais reservatórios e/ou hospedeiros, variáveis estas que foram tidas em consideração no presente estudo.

Procedeu-se assim, um estudo clínico-epidemiológico baseado na análise de dados obtidos através de inquéritos aplicados aos doentes, de forma a determinar a existência ou não, dos referidos factores que se sabe estarem directamente associados à doença.

Da análise dos inquiridos, no que se refere à proveniência da população alvo (doentes), verificou-se que além dos residentes na própria cidade do Lubango, participaram no estudo também doentes vindos de outros municípios da província da Huíla e ainda doentes provenientes de outras províncias do país nomeadamente, Cabinda, Cunene Benguela, Huambo, Luanda e Namibe. No que respeita ao género, ressalta que a maioria dos inquiridos foram mulheres. Este facto vem inverter a conhecida tendência que aponta os indivíduos do género masculinos como os mais predominantemente representados na maioria dos estudos de Leptospirose <sup>(45,58,84)</sup>.

No nosso estudo porém, esta discrepância pode ser explicada pelo facto que, nas Regiões Africanas de uma forma geral, nas quais Angola não é excepção, as mulheres são as maiores responsáveis pelas actividades domésticas e do campo “lavras”, sendo consideradas como mulheres batalhadoras que mantêm o sustento da família <sup>(42)</sup>. Por isso, as mulheres são também mais susceptíveis às doenças, dada a sua proximidade e contacto com lama, solos húmidos, águas de charcos impróprias para o consumo, entre outros factores de risco. Pode considerar-se ainda que a causa da desproporção (quase 2:1) encontrada no nosso estudo, se deva ao facto dos homens Africanos não terem o hábito de recorrerem aos serviços de saúde logo no início da doença, fazendo-o apenas quando a situação se agrava, daí também a sua menor representatividade neste estudo.

Todavia e de acordo com a literatura <sup>(58)</sup> não existe diferença na susceptibilidade da infecção quando ambos os géneros estão expostos a fontes de contaminação, observação esta, que o nosso estudo também corrobora.

Ainda no que diz respeito à caracterização da população alvo face a variáveis como a idade e ocupação/profissão, observou-se que foi nas faixas dos 11-20 e dos 21-30 anos que se verificou o maior número de doentes, sendo as mulheres domésticas, camponesas e estudantes as mais representadas.

Do ponto de vista laboratorial, foram realizadas as técnicas disponíveis no (IHMT), que incluíram o teste de rastreio (MACROLepto), TAM e ainda as abordagens moleculares, nomeadamente a amplificação de DNA de *Leptospira* (PCR), complementada por sequenciação.

Todas as amostras séricas cujo resultado pelo teste MACROLepto foi positivo e/ou não conclusivo foram confirmadas pela TAM, de acordo com as orientações da OMS <sup>(102)</sup>. Como esperado, verificou-se que a técnica de referência, dada a sua maior sensibilidade, foi capaz de detectar anticorpos específicos em 40% do total de amostras, comparativamente ao teste de rastreio. Importa ainda dizer que a TAM também permitiu confirmar a seropositividade de amostras inicialmente analisadas pela MACROLepto também com resultado positivo. Este facto evidencia a importância de, pelo menos, nas áreas geográficas onde não seja possível recorrer a um Laboratório de Referência para a Leptospirose, como se verifica em Angola, a disponibilidade de um teste de rastreio como o que se utilizou neste estudo, pode e deve constituir uma ajuda muito válida, já que consegue antecipar uma potencial infecção por leptospiros, permitindo que o doente inicie a terapêutica adequada e em tempo útil.

É no entanto, importante, que o teste de rastreio a adoptar inclua preferencialmente serovares de *Leptospira* spp. presentes na referida região, para aumentar a respectiva sensibilidade já que, como se provou, o teste já comercializado e utilizado em algumas regiões (Províncias) de Angola, quando aplicado à população alvo deste estudo, não conseguiu responder satisfatoriamente, não tendo identificado nenhum caso positivo. Parece-nos pois, muito relevante considerar este facto, porque põe em evidência a necessidade de conhecer leptospiros prevalentes em cada região. Este conhecimento é assim muito relevante para a preparação dos referidos testes. De facto, e como se percebeu, um kit comercial com uma base antigénica prevalente num país/continente pode não ser útil noutra.

Ainda quanto a resultados do laboratório, desta vez TAM *versus* PCR, verificou-se que as amostras que revelaram inicialmente um resultado negativo pela técnica de PCR 54%, mostraram pela TAM um resultado positivo em 25% das mesmas. Com estes resultados, parece-nos ser lícito dizer, e também de acordo com a literatura, que: *i)* A técnica de PCR só é eficaz para detectar a infecção no início da doença (fase precoce) <sup>(16,24)</sup>; e *ii)* a escolha do método deve depender da fase evolutiva da infecção, <sup>(99)</sup>. Pelo que, se admite que os referidos resultados inicialmente negativos são justificados por corresponderem a doentes eventualmente em fase tardia. Isto, apesar dos doentes terem dado a informação sobre o início dos sintomas e dias de evolução, razão pela qual foram

seleccionadas para análise de PCR, admite-se que os mesmos possam não ter sido totalmente precisos nas suas informações.

Estas vertentes podem estar na base fundamental destes resultados, uma vez que das 193 amostras apenas 16% foram amplificadas.

Sendo que estes correspondem ao grupo de indivíduos de idade profissionalmente activa (idade produtiva), consideradas também, idade sob risco de infecção por *Leptospira interrogans* <sup>(74,84)</sup>. Neste caso os resultados encontrados nas faixas etárias mais afectadas estão de acordo com o que já é reconhecido, que aponta a maior prevalência nos referidos escalões etários, resulta do desenvolvimento das actividades de maior exposição a fontes de infecção <sup>(29, 44)</sup>.

Em relação a área de proveniência/residência aquando da análise das amostras com resultado positivo e confirmado pela TAM, observou-se que três doentes eram provenientes das províncias de Cunene, Benguela e Huambo. Isto corrobora, de certa forma a prevalência de 15,6% referida para o Lobito (Benguela) em 2011 por Garcia <sup>(42)</sup>, e a de 14%, no Huambo referida por Gabriel-Fortes, 2012 <sup>(40)</sup>.

Na interpretação feita sobre a variável ‘ocupação/profissão’, além da profissão ‘camponesa’ cuja actividade é de grande exposição ao risco de infecção com leptospiros, através do contacto com solos húmidos como referido por diversos autores <sup>(15,17)</sup>, também a ocupação ‘estudante’ mostrou ser de grande importância no contexto dos indivíduos com resultado positivo para Leptospirose, ocupando uma segunda posição no conjunto das diversas profissões, incluídas no inquérito. Este grupo de indivíduos (estudantes) apesar de essa ocupação não fazer parte das consideradas ocupações de risco para Leptospirose eles alegaram que nos períodos livres (quando não estão na escola) dedicam-se à realização de outras actividades, das consideradas associadas a um maior risco de infecção, como por exemplo estarem nos pastos, o facto de ajudarem as mães nas lavras e os pais na lida do gado.

Houve ainda alguns que responderam terem o costume de nadar em charcos ou rios. É de salientar que este grupo é constituído na sua maioria por individuo com idade inferior a 16 anos. Sabe-se que os indivíduos nesta idade têm, por vezes, atitudes e comportamentos de risco que os expõem a várias doenças, também dificilmente

observam as medidas de higiene, além de realizarem actividades de aventura, e brincam nas lixeiras e noutros locais imundos, situações estas, já reportadas por diversos autores<sup>(42,46,77)</sup>.

Por este facto, e apesar de que existem categorias profissionais especificamente conhecidas como de risco, não podemos deixar de admitir que a Leptospirose pode afectar quaisquer profissões, independentemente da situação ou local onde se encontrem. Com estes resultados volta a enfatizar-se a variável ‘ocupação’ como um aspecto fundamental na exposição à doença. De facto, na análise destes dados esperávamos encontrar casos de Leptospirose ou de seroreactividade naquelas ocupações profissionais consideradas também de risco elevado como agricultores, veterinários, trabalhadores de esgotos, entre outros, tal como referidos por diversos autores<sup>(10,16,17,35,101,104)</sup>. No entanto, os resultados do presente estudo diferem desses autores, pois observou-se que além da ocupação ‘estudante’ já referida, foram as ocupações ‘doméstica’ e ‘professor’, as que se seguiram às ocupações anteriormente referidas, contribuindo para o número de resultados positivos. Segundo a OMS este risco de exposição deve-se sobretudo, ao contacto directo com cães e/ou nas próprias residências, quando estas estão infestadas por roedores. Há também um outro aspecto relevante e que é habitual em Países subdesenvolvidos, apesar das populações terem e dedicarem-se a uma ocupação profissional no seu dia-a-dia, que é a realização de actividades extra (lavra ou hortas), em situação de “part time”, o que também pode contribuir para a sua exposição ao risco de infecção.

Quanto à variável ‘contacto directo com roedores e/ou potenciais hospedeiros’ sabe-se que o contacto com estes animais portadores crónicos de leptospiras, aumentam a possibilidade de expor a população e potenciam o risco de contrair a infecção<sup>(8,48,49,58)</sup>. Também é defendido por muitos autores que na epidemiologia da Leptospirose estão envolvidos factores socioeconómicos bem com factores ambientais que favorecem a sobrevivência da bactéria na natureza, expondo as populações ao risco<sup>(58)</sup>.

Com base nestas premissas e opinião de tantos autores, no presente estudo, de acordo com os dados dos inquiridos, e os indivíduos dos quais se obtiveram resultados positivos, mostram que quase na totalidade da amostra (97%), responderam terem presença de “ratos” nas suas residências, enquanto um terço dos inquiridos,

responderam terem contacto com o cão, sendo este o seu “animal de guarda”; e ainda admitiram consumirem água não tratada, contactarem com depósitos e destinos de resíduos ao ar livre, e procederem ao aprovisionamento de alimentos em condições impróprias (ao ar e fora do frigorífico). Alguns destes dados, quando tratados do ponto de vista estatístico, mostraram, por exemplo, que para a variável ‘contacto com águas não tratadas’ existe um risco relativo igual a 2, o que significa que a população exposta tem duas vezes maior risco de contrair Leptospirose comparativamente à população não exposta. Situação análoga foi verificada quanto à exposição ao lixo, também aqui se verificou existir um risco de Leptospirose 1,8 vezes maior na população exposta, face aos indivíduos não expostos.

De uma maneira geral estas são situações que podem estar relacionadas com a doença, e apesar de não se conhecer a prevalência da Leptospirose na Huíla, os factores predisponentes, mostram como esta população é bastante susceptível em contrair a doença uma vez que existem todas as condições propícias para persistência e proliferação das bactérias no ambiente <sup>(57,58)</sup>.

Em relação ao contacto com os cães, sabe-se por alguns estudos, que aqueles são considerados potenciais hospedeiros, de grande importância epidemiológica sendo portadores, em particular do serovar Canicola <sup>(16,48,49,58)</sup>. No entanto, vários outros estudos apontam para uma prevalência de serogrupos/serovares nos cães, tais como Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Australis, Pyrogenes, entre outros <sup>(71)</sup>.

Com base nestes dados e nos resultados obtidos podemos destacar também o papel preponderante do cão como ‘veículo’ de transmissão dos agentes da Leptospirose, por estabelecer um estreito contacto com os humanos. De acordo com Faine e colaboradores, 1999 <sup>(38)</sup>, o cão pode manter e eliminar as bactérias por longo período de tempo, por vezes de forma assintomática ou quase, após obter a melhoria de uma infecção, situação em que pode então infectar os humanos, de forma accidental.

Em alguns estudos realizados são referidos ainda outros animais como suínos, bovinos, caprinos e cavalos com intervenção directa no ciclo de transmissão de leptospiras. São disto exemplo um estudo realizado em 1991, por Baptista <sup>(12)</sup> na mesma localidade do presente estudo, no qual o autor aponta para uma prevalência de 15,5% em bovinos.

No entanto, no presente estudo, estes animais não se evidenciaram como muito relevantes, apesar da população estudada ter como actividade predominante a agropecuária, e ser proveniente de áreas suburbanas, onde tradicionalmente estão presentes estas espécies animais. Não podemos deixar de frisar que este estudo foi feito numa área urbana (cidade do Lubango), apesar de sete dos participantes terem referido contactarem com alguns destes animais em qualquer situação.

Além do contacto com os animais, no presente estudo, foram evidenciadas também condições ambientais e de saneamento básico as quais, como se sabe, facilitam a sobrevivência das bactérias no ambiente, e uma possível contaminação, como tem sido já amplamente referido por diversos autores <sup>(4,14,58,79,84)</sup>, porém, entendemos que mais investigação é necessária, de forma a determinar os principais reservatórios na área, aspecto que não foi contemplado neste estudo.

Ainda no que se refere as variáveis relacionadas com o saneamento, salienta-se o consumo de água não tratada, supostamente contaminada, o que constitui uma situação de alto risco quanto à ocorrência de várias doenças que não apenas a Leptospirose. Sendo o referido consumo considerado como o factor ambiental mais importante na manutenção das leptospiras <sup>(58)</sup>, uma vez contaminada com urina de animais infectados, constitui um meio de grande relevância na transmissão das referidas bactérias, enquanto agentes etiológicos da Leptospirose, como referido por Faine e colaboradores em 1999<sup>(38)</sup>. De facto, não é demais referir a importância do consumo de água não tratada ao longo da história da Leptospirose nas comunidades humanas. Existem registos de vários surtos epidémicos devidos precisamente ao consumo de água contaminada como foi o caso do surto que ocorreu em Lisboa, Portugal em 1931, numa população que tinha consumido água de um fontenário contaminado com a urina de ratos, como citado em 2006 por Vieira <sup>(99)</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o consumo de águas não tratadas (residuais e outras) é praticado em quase todo mundo principalmente nos países subdesenvolvidos. Vários são os motivos que impulsionam o seu uso, por um lado a escassez constante de água potável nas torneiras, estiagens prolongadas ou secas, aumento desordenado das populações nas cidades, necessidade de usá-la como recurso para fertilização dos seus cultivos. Neste âmbito, os participantes do estudo que mostraram anticorpos

anti-*L. interrogans* (79,4%) referiram o consumo de água imprópria e aproximadamente metade alegam a falta de condições de saneamento básico nas suas habitações (esgotos, contentores) o que os leva a depositar resíduos “lixo e água” ao ar livre.

Sabe-se que nos Países subdesenvolvidos como é o caso de Angola, devido aos efeitos de guerras e outros, muitos esforços estão a ser envidados para colmatar as deficiências nestes contextos, mas ainda há muito para fazer, já que existem situações de habitação, onde o saneamento básico é muito deficitário, e a este facto acrescem, de certo modo, alguns valores culturais como por exemplo “famílias enormes” (uma moradia com mais de 10 indivíduos), tornando difícil manter o saneamento neste local devido ao aglomerado de população. Além destas situações podemos considerar a falta de formação académica e informação (educação para a saúde), baixa renda, principalmente em áreas suburbanas o que se destacou neste estudo, com maior prevalência em relação à área urbana.

Deste modo, os nossos resultados reforçam a ideia de Bertherat e colaboradores em 1999 <sup>(15)</sup>, onde salientaram que condições de saneamento básico pouco eficientes, entre outras situações já referidas, são factores de risco para a ocorrência da doença, dados estes também apontados por outros autores <sup>(4, 58, 74, 79, 91)</sup>.

No que se refere às manifestações clínicas, uma vez que a Leptospirose tem um quadro clínico sobreponível a outras doenças, que vão desde situações assintomáticas, graves e até fatais, em regra é necessário a confirmação do diagnóstico laboratorial <sup>(5,16,38)</sup>.

No presente estudo foi registada uma variedade de manifestações sendo que a febre referida por cerca de 91% dos participantes, como sendo o sintoma mais frequente, apesar de, não devermos ignorar que foi precisamente a febre o nosso critério ‘*major*’ de inclusão. No contexto estatístico, o risco relativo da febre estar associado à Leptospirose foi de 8,5% nos doentes com resultado positivo pela serologia e de 14% nos avaliados pela PCR, o que está em consonância com a patofisiologia da doença (fase aguda e fase mais tardia).

Os dados obtidos no laboratório permitiram assim, confirmar a origem da febre associando-a ao diagnóstico de Leptospirose. Seguiram-se por ordem crescente de

frequência as cefaleias, calafrios e mialgias, sintomas que também podem ocorrer no decurso da evolução da Leptospirose, tal como referido por vários autores <sup>(17,58)</sup>.

Todavia apesar da Leptospirose ser caracterizada por febre não podemos deixar de pensar noutras situações de presença de anticorpos de leptospiras por longo tempo. Na análise dos dados obtidos nos inquéritos observou-se que cinco utentes assintomáticos (dadores de sangue, *checkup*) e destes cerca de 3% tiveram uma serologia positiva, confirmada pela técnica de referência e três tiveram um resultado não conclusivo pelo teste de rastreio mas, que se revelaram negativos quando da abordagem molecular.

Com este facto, podemos deduzir que os doentes com possível exposição ou contacto com leptospiras podem conter anticorpos no soro e estes se tornarem detectáveis por longos períodos de tempo. Sabe-se também que a presença de anticorpos em algumas situações como é o caso dos denominados portadores renais crónicos, podem não ser considerada sinónimo de doença, como referido por vários autores <sup>(2,16,41)</sup>. Um estudo realizado por Ganoza e colaboradores em 2010, em indivíduos assintomáticos descobriu que 5% (314) desses indivíduos (mulheres) duma vila rural da Amazônia, sem evidências clínicas de Leptospirose foram cronicamente colonizados pela bactéria.

Ainda sobre as manifestações clínicas “diagnóstico clínico” destacamos algumas, reconhecidas como compatíveis e características na Leptospirose, sendo que os nossos resultados mostraram a presença de comprometimento de vários órgãos e sistemas, como o renal, hepático e respiratório, sob forma de infecção urinária, icterícia, broncopneumonia e bronquite respectivamente, e ainda hemorragia, observada na forma de epistaxis e hemoptises, embora em menor frequência.

Apesar dos doentes apresentarem sinais ou quadro clínico compatíveis com Leptospirose e com presença de evidência serológica são necessários, outros estudos, principalmente que permitam a obtenção de segundas amostras para poder acompanhar a cinética de anticorpos específicos <sup>(58)</sup>.

A disfunção hepática (icterícia) é um sinal *major*, quando acompanhada por disfunção renal, podendo levar à morte, situação conhecida como síndrome de Weil a forma mais grave de Leptospirose <sup>(16,38,73)</sup>, embora nos últimos anos, esta síndrome de Weil, considerada como causa de morte está a dar lugar a hemorragia pulmonar, como

demonstrado num estudo onde é referida uma taxa de 75% de ‘casos’ de Leptospirose associados à presença de icterícia <sup>(9,95,96)</sup>. No presente estudo, a presença de icterícia também se revelou como uma manifestação forte de associação aos casos de Leptospirose, estatisticamente significativa. No que se refere ainda ao ‘diagnóstico clínico’, os dados obtidos através dos processos de doentes internados destacou-se a malária complicada em 29,4% dos doentes. E destes, sete tiveram resultados confirmados pela técnica de referência, mas com o teste de gota espessa negativo, isto é, sem evidências laboratoriais de malária. Como os resultados mostram, estes casos de síndrome febris podem dever-se a Leptospirose embora mascarados por malária. De acordo com Brown e colaboradores, em 2010 <sup>(25)</sup>, nos países com doenças endémicas (como dengue e malária) em casos de síndrome febril, sem evidências laboratoriais robustas, devem ser investigados para Leptospirose.

Alguns profissionais de Saúde Pública, veterinários e médicos raramente consideram a Leptospirose no diagnóstico clínico, mesmo quando a febre é desconhecida, como referiu Machang’u em 1992, citado por Katakweba e colaboradores, 2012 <sup>(51)</sup>. Estes profissionais defendem que a doença pode ser facilmente tratável, bastando a “toma” de um antibiótico, é por isso negligenciada. Seguindo esta lógica e em relação aos nossos resultados podemos pensar que a prescrição e o uso excessivo de antibiótico acaba por mascarar as possíveis manifestações por Leptospirose, já que 20% dos doentes tinham a prescrição e uso de antibiótico e destes cerca de 5,8% foram positivos pela MACROLepto, confirmado pela TAM. Esta situação é preocupante porque além de estar a mascarar outras manifestações (como indução de anticorpos na Leptospirose), segundo a OMS, o uso constante de antibióticos pode tornar o doente susceptível a outras infecções, ou então, desenvolver resistência aos fármacos. Por outro lado, apesar da Leptospirose ser normalmente tratada com antibioterapia e não tem um impacto muito grande na mortalidade, principalmente na fase anictérica de acordo com Monteiro, 2003<sup>(74)</sup>, ela tem importantes implicações na ocorrência e complicações de outras doenças, custos hospitalares, tratamentos diários, principalmente para os antibióticos de última geração bastante dispendiosos, e pode ainda afectar directa ou indirectamente outras áreas económicas. A determinação precoce da Leptospirose pode servir de alerta e orientar os clínicos na gestão de doentes evitando as complicações e consequentes custos.

Duma forma global, os resultados positivos obtidos por avaliação das técnicas (MACROLepto, TAM, PCR) permitiram observar uma sobreposição de 3% de doentes cujo resultado positivo foi comum às três técnicas, onde o grau de concordância dos resultados entre elas foi de 0,99, embora se saiba que cada uma tem a sua especificidade.

Nas amostras com resultados positivos observaram-se reactividade em 19 serogrupos/serovares, com maior destaque para Icterohaemorrhagiae (23,5%), Hebdomadis e Javanica (14,7%), Australis (11,7%) e Hardjobovis (8,8%). De acordo com um estudo realizado em 2003 por Bharti e colaboradores <sup>(16)</sup>, os serogrupos Icterohaemorrhagiae, Ballum (Arborea) têm como reservatório por excelência as ratazanas. O serogrupo Javanica é considerado como representante da espécie patogénica *L. borgpetersenii* de acordo com Homem, 2001 <sup>(49)</sup>, podendo ser encontrado também nos bovinos. Comparando com o nosso contexto podemos considerar a hipótese de que os agentes da Leptospirose na região da Huíla podem estar a ser transmitidos por roedores, canídeos e bovinos.

O serogrupo Australis (Bratislava) encontra-se associado a cavalos, sendo estes os seus hospedeiros/reservatórios <sup>(16)</sup>, porém, neste estudo não foi possível verificar tal relação, pois nos doentes com resultado positivo nenhum referiu ter tido contacto com estes animais. Uma explicação possível é o facto de os cavalos não terem sido incluídos no inquérito, uma vez que estes animais não são geralmente encontrados na área, em grande número, em comparação com os assinalados no inquérito (canídeos, bovinos, caprinos, suínos e, claro, os roedores). Os demais foram colocados na categoria “outros”, mas mesmo assim, nesta categoria não se observou nenhum caso positivo. Ainda sobre o serogrupo Australis, este tem sido descrito também em gado, ovelhas, ratos, burros, cães, e ouriços, tal como referido em 2011, por Biggs e colaboradores <sup>(17)</sup>.

A par disto pensamos que, as leptospiras representantes do serogrupo Australis, na Huíla, podem estar a colonizar outros reservatórios que não sejam os mais comumente conhecidos, admitindo-se a hipótese de que estes serovares podem estar mesmo, a ser dispersos por roedores, tendo sido estes os mais referidos.

Nos resultados serológicos obtidos por Garcia em 2011<sup>(42)</sup>, destacaram-se três serovares: Copenhageni, Sejroe e Australis, tendo sido verificado no presente estudo um resultado análogo no que respeita aos serovares Copenhageni e Australis, enquanto os outros diferiram. Isto leva-nos a admitir que apesar de ser no mesmo país, as condições ambientais que mais facilitam a persistência e a sobrevivência do agente etiológico, deverão ser diferentes, numa e noutra região.

É de salientar que, para os doentes que reagiram com mais do que um serovar, considerou-se como infectante o serovar com maior título, pois os demais tiveram reacções cruzadas entre si.

Os títulos observados com maior frequência foram superiores ou iguais a 1:100 numa frequência de 60 casos, seguindo-se títulos de 1:200 em 44 casos. O título mais elevado foi de 1:800 observado para os seguintes serovares: Copenhageni, Arborea, Panama e Pyrogenes.

A interpretação de resultados serológicos para o diagnóstico de Leptospirose é difícil, por um lado, devido às reacções cruzadas entre leptospiros, por outro, ausência de anticorpos induzidos pelo uso de antibiótico, e ainda pelas dificuldades de consenso de títulos observados<sup>(27)</sup>.

Dado o carácter bifásico da doença, e a necessidade de avaliar as amostras para detectar a presença de DNA leptospírico no soro na fase aguda, recorreu-se a uma abordagem molecular (PCR) utilizando *primers* baseados no gene *hap1*, como já referido.

Os resultados obtidos pela análise molecular mostraram que os referidos *primers* são específicos para as espécies patogénicas de acordo com estudos realizados por diversos investigadores<sup>(21,56)</sup>. No presente trabalho, pudemos igualmente verificar que estes *primers* amplificaram apenas DNA de leptospiros representantes de uma estirpe patogénica (RGA) de *L. interrogans*. No que se refere à sensibilidade a PCR mostrou algumas limitações, uma vez que a detecção de DNA foi apenas até à diluição de  $10^5$  bactérias/ml, isto leva-nos a pensar que o problema esteja relacionado com a extracção de DNA, embora todas as condições aplicadas estivessem dentro dos parâmetros recomendados pelo protocolo, adoptado pelo Laboratório. O próprio

procedimento da PCR foi bem-sucedido, isto é, sem contaminações, e com o controlo positivo a revelar o fragmento (banda) na direcção e tamanho esperado.

Admitimos que esta limitação talvez esteja relacionada com a solução de lise e sobretudo com a própria estrutura da parede celular das espiroquetas que é muito difícil de lisar. Esta situação poderá assim, explicar a baixa sensibilidade nos resultados obtidos pela PCR, porque se estes doentes apresentarem uma carga bacteriana abaixo de  $10^5$  bactérias/ml não é possível detectá-la, pelo que se obteve DNA leptospírico em apenas 16 % de doentes. Isto é tanto mais importante, quanto a presença de leptospiras no sangue) pode influenciar a evolução da doença e até o seu prognóstico, é disto exemplo, um estudo realizado em 2011 na Nova Caledónia por <sup>(97)</sup> Tubiana e colaboradores, em doentes com Leptospirose que mostrou que a presença de, pelo menos,  $10^4$  bactérias/ml no sangue pode ser considerado como um limiar crítico de desenlace fatal.

Os resultados obtidos do produto amplificado através do recurso a *primers* desenhados no gene hap1, que foram utilizados como ferramenta para rastrear a prevalência de *Leptospira* spp. em amostras serológicas humanas, mostrou DNA leptospírico em cerca de 16% dos doentes avaliados por esta metodologia, tendo a sequenciação revelado, homologia com três espécies genómicas: *L. borgpetersenii*; *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Destas, a espécie *L. borgpetersenii* foi a mais prevalente, seguida de *L. interrogans* com os serovares Javanica, Hardjobovis, Balico, Santarosai, Lai, Ballum e Pomona.

As leptospiras pertencentes à espécie genómica *L. borgpetersenii* constituem uma importante fonte de infecção para os humanos e também para outras espécies animais, nomeadamente para os bovinos, levando nestes últimos, a uma alta incidência na infertilidade e perdas de lactação, como já amplamente referido por diversos autores<sup>(2,28)</sup>. Quando comparamos os resultados moleculares agora obtidos, com os resultados moleculares de um estudo anterior realizado por Garcia em 2011, embora em localidades diferentes mas no mesmo País, encontramos alguma coincidência, já que nesse estudo foram identificados os serovares Copenhageni e Lai ambos pertencentes à espécie genómica *L. interrogans*, tendo agora o serovar Lai também sido por nós identificado em algumas das nossas amostras.

Importa também referir que as espiroquetas pertencentes à espécie genómica *L. interrogans* que segundo a literatura, têm como reservatórios de eleição os roedores, sendo estes como referido por Levett em 2001 <sup>(58)</sup>, reconhecidos, como sendo os grandes responsáveis associados aos casos graves de Leptospirose, pela sua ampla distribuição em vários locais e dado o seu alto grau de adaptação. Ainda de acordo com outros autores, nomeadamente, Gonçalves (2009) <sup>(44)</sup> os roedores estão presentes principalmente em locais onde haja infra-estruturas degradadas, condições de saneamento básico deficitárias e em áreas suburbanas. Assim, os resultados agora obtidos na análise molecular são coerentes com outros autores e, por outro lado, confirmam e consolidam a interpretação feita na análise serológica da população de doentes do presente estudo.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os resultados obtidos neste estudo permitiram determinar que a Leptospirose está presente nos doentes febris, assistidos no Hospital Central Dr. Agostinho Neto, o que aponta para a necessidade de incluir esta doença no diagnóstico diferencial de doentes febris, especialmente entre os grupos de risco ocupacional mais prevalentes, (Camponesas e estudantes), como este estudo demonstrou. Além da província da Huíla, parece-nos relevante estender este mesmo diagnóstico diferencial a outras províncias do país.

O presente estudo aponta para uma taxa de sero-ocorrência entre a população alvo, da ordem dos 40%, o que nos parece, para um primeiro estudo (rastreamento), e numa amostra (ainda) limitada, uma taxa com um significado que merece atenção das Autoridades de Saúde locais.

Este estudo também permitiu identificar as espécies *L. borgpetersenii* e *L. interrogans* como as mais prevalentes na região, bem como conhecer os principais serovares Australis, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. Sendo que a maior ocorrência do serovar Icterohaemorrhagiae aponta de forma inequívoca para a presença de roedores, como transmissores de leptospirosas na região. Foi ainda possível através da presente investigação perceber as variáveis de risco em relação à infecção em comparação com outros estudos realizados noutros países, embora seja necessária mais investigação para sustentar os dados agora obtidos.

Uma vez que existem diferentes factores associados à Leptospirose em ambientes urbanos e suburbanos a prevenção da doença deve ser agora mais dirigida, focalizando as várias fontes de contaminação salientadas no estudo.

Com estes resultados, embora não sejam significativamente abrangentes, o seu impacto serve de alerta, e podemos dizer que a população de algumas regiões de Angola está exposta às leptospirosas presentes no ambiente envolvente.

Identificados e conhecidos os serogrupos torna-se possível a implementação de testes de diagnóstico rápido e de fácil execução bem como a aplicação dos respectivos protocolos.

Queremos acreditar também, que este estudo vai ajudar no esclarecimento das principais causas de febre indeterminada, apesar de ser um estudo de rastreio, constitui, necessariamente um estímulo para que outros possam desenvolver-se.

No que respeita a metodologia é importante referir que as técnicas utilizadas, quer a TAM quer a PCR e MACROLepto, mostraram serem ferramentas muito úteis para avaliar a ocorrência da Leptospirose, podendo futuramente vir a serem adoptadas no Hospital Central do Lubango; contribuindo também para uma resposta do laboratório face ao diagnóstico clínico de Leptospirose, em particular, nas síndromes febris agudas, não confirmadas como Malária.

## **5.1 NOVIDADE CIENTÍFICA**

O significado teórico deste estudo assenta na elaboração de um material bibliográfico actualizado e de apreciável nível científico sobre a Leptospirose que será a sustentação teórica de outras pesquisas neste campo assim como contribuirá para o enriquecimento do conhecimento de quem está nesta área de ensino, pois estará disponível para consulta.

Quanto ao significado prático do estudo, consistiu na realização de um rastreio sobre a Leptospirose nos doentes assistidos no Hospital Central do Lubango para conhecer; i) a sua ocorrência e saber se a doença está subjacente a situações de febre indeterminada; ii) conhecer as principais variáveis de risco, a fim de ajudar na implementação de medidas de controlo e prevenção da doença; e iii) contribuir para a elaboração de uma proposta para a referida prevenção.

## 5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ Propor a Leptospirose no diagnóstico diferencial de casos de síndrome febril indeterminada, para o que vai ser necessário estabelecer as condições para um Laboratório especializado para Leptospirose e implementar protocolos de diagnóstico.
- ❖ Propor a realização de mais estudo de investigação numa escala ainda maior, para o conhecimento da prevalência da doença e identificação dos principais reservatórios na região.
- ❖ Sugerir a implementação de um teste rápido para Angola, província da Huíla e outras, com base no conhecimento de serovares circulantes nas mesmas.
- ❖ Propor o treinamento do pessoal técnico para poder responder ao diagnóstico laboratorial da Leptospirose.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. **Abdulkader RCRM, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, da Silva MV.** Leptospirosis severity may be Associated with the intensity of humoral immune response. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, [Internet]. 2002; **44** (2):79-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048544>.
2. **Adler B & de la Peña Moctezuma A.** Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, [Internet]. 2010 Jan 27 [cited 2023 sep 18]; **140** (3-4):287-296. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345023>.
3. **Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM.** Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad. Med.*, 2005; **51**: 195-200.
4. **Almeida LPDE, Fernando L, Brod CS, Germano ML.** Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil \* Serological survey of leptospirosis among environmental sanitation workers in an urban locality in southern . 1994; **2** –7.
5. **Alonso BR, Gómez de Haz HJ, Maza BP, y CRUZ RP.** Diagnóstico y Tratamiento de la Leptospirosis Humana. *Rev Cub Med integr.* 2001; **17**(1):68-73
6. **Anzai EK.** Utilização PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães Naturalmente infetados por *Leptospira* spp. *Dissertação do Mestrado em Ciências Animal*, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.2006; **48**pp.
7. **Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, et al.** Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Sep [cited 2013 Sep 23]; **33**(5):375–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307019>.

8. **Ávila MO, Furado LRI, Teixeira MM.** Aglutininas anti leptospira em Cães na área de Influência do Centro de Controle de Zoonoses Pelotas R. S, Brasil, no ano de 1995. *J Cienc. Rural*, 1998; **28**:107-110.
9. **Assimakopoulos SF, Fligou F, Marangos M, Zotou A, Psilopanagioti A, Filos KL.** Anicteric leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome: a case series study. *Am J Med Sci*, 2012; **344** (4):326-9.
10. **Azevedo SS, Fernandes ARF, Queiroga CJ, Moraes ZM, Santos CSAB, Vasconcellos SA.** Occurrence and risk factors associated with Leptospirosis in a Veterinary hospital in the semiarid of the Paraíba state, Northeast region of Brazil. *J.vet.Sci.v.2011*; **48**: (2)161-166.
11. **Bagani MD.** Evaluation of Commercially available rapid serologic tests for diagnosis of Leptospirosis'. *Clin Microb* 2003;41 (2): 803-9.
12. **Baptista F.** Brucelose e Leptospirese Bovina nas Explorações Pecuárias Tradicional Empresarial da Província da Huila (Angola). *Tese de Mestrado Brasil*, 1991: **94** pp.
13. **Barochimako AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis M G, Riley LW.** Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J. Clin Microb.* 2001; **39** (1):191-19.
14. **Benacer D, Woh PY, Mohd Zain SN, Amran F, Thong KL.** Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environ.* [Internet]. 2013 [cited 2013 Sep 23]; **28** (1):135–40. Available from: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jsme2/ME12154?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>

15. Bertherat E, Renaut A, Nabias R, Dubreuil G, Georges-Courbot MC. Leptospirosis and Ebola virus infection in five gold-panning villages in northeastern Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 1999 Apr; **60** (4):610–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348236>.
16. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias M A, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 2003; **3** (December): 757-71.
17. Biggs HM, Bui DM, Galloway RL, Stoddard R a, Shadomy S V, Morrissey AB, et al. Leptospirosis among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 2011 Aug [cited 2013 Sep 23];85(2):275–81. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3144825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
18. Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, et al. Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular feature. *J Clin Microbiol*, 2012a; **50**: 307–311.
19. Bourhy P, Storck CH, Theodose R, Azeitona C, Nicolas M, Hochedez P, et al. (2012 b). Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies *PLoS negl Trop Dis* 2012b; **7** (3):2114.  
<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0002114>
20. Brandão AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva M V, Abrão R V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* [Internet]. 1998 Nov; **36** (11):3138– 42. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=105289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- 21. Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, et al.** Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2013 Sep 23];243(2):437–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686847>.
- 22. Brito PL.** Sensoriamento remoto na identificação de elementos e tipologias urbanas relacionadas a ocorrência da leptospirose no subúrbio Ferroviário de Salvador Baía, *Teste de Doutorado* 2010; **279** pp.
- 23. Brouqui P, Baranyon G, Raoult D.** Le Leptospirosis EMC: *J. Maladies; Infectius* 1990; **10**:1-10.
- 24. Brown PDC, Gravekamp DG, Carrington H.** Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*, 1995; **43**: 110-114.
- 25. Brown MG, Vickers IE, Sala RA, Smikle MF.** Leptospirosis in suspected cases of dengue in Jamaica, 2002-2007. *Trop Doct Microbio* 2010; **40**(2):92-4.
- 26. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen P a, et al.** Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 2006 Sep 26; **103** (39):14560–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1599999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 27. Carreira TMVPQ.** Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. *Dissertação de Mestrado de Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa, 2009; **65** pp.

28. **Chauca MFA.** Prevalência de Leptospirosis bovina en dos localidades de Puno en época seca y determinación de factores de riesgo. *Tesis titulo med vet Perú*, 2008; 54 pp.
29. **Ciceroni L, Stepan E, Pinto a, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, et al.** Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur. J. Epidemiol.* [Internet]. 2000 Jan;16(1):79–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780347>.
30. **Collares-Pereira MMI.** Contribuição para o estudo do género *Leptospira* em Portugal, Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, 1992: 300 pp.
31. **Collares-Pereira, MMI.** *Leptospira* e leptospirosis: epidemiologia e diagnóstico laboratorial. In: *Cadernos de Doenças Infecciosas*, Vol. III, Eds. Antunes F. & Forte M, Faculdade de Medicina de Lisboa, 1994; 19-28.
32. **Cristina B.** Leptospirose Pesquisas em teste rápido para o diagnóstico fontes de consulta: Reportagem retirada na íntegra da revista Médica Nº12 2009;22 a 27pp [Acedido em 24 Abril de 2013].  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_leptospirose](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_leptospirose).
33. **De SOUZA VR.** Leptospirose: Aspectos Epidemiológicos, clínicos e Laboratoriais: Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao I curso de Análises Clínicas e Gestão de laboratório da faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Vale do Rio Doce, como requisito para obtenção do título de especialista em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório 2011.
34. **Derne BT, Fearnley EJ, Lau CL, Paynter S, Weinstein P.** Biodiversity and leptospirosis risk: A case of pathogen regulation? *Medical Hypotheses*. 2011; 77:339-344.

- 35. Desai S, van TU, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, et al.** Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis.* 2009; **48** (6): 691-7.
- 36. Effler PV, Domes HV, Bragg SL, Ayetin DM, Sasaki.** Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospiroses in Hawaii. *J of Clin Microbiology*; 2000; **38**: 1081-1084.
- 37. Elkhoury et al.** Guia de Leptospirose Diagnóstico e manejo Clínico. *Secretaria de vigilância de saúde, Brazil*, 2009; **34**pp [Acedido em 17 de Junho de 2012]; <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/1805/leptospirose.htm>
- 38. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd edition. *Melbourne Medi Sci, Austrália*,1999; **326** pp.
- 39. Felt SA, Wasfy MO, El-Tras WF, Samir A, Rahaman BA, Boshra M, et al.** Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 2011Mar [cited2013Sep23]; **84**(3):420– 5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 40. Fortes-Gabriel EVF.** Contribuição para o diagnóstico diferencial em pacientes com síndrome febril suspeita de Malária em duas províncias de Angola. *Resumos das III Jornadas Cientificas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UNL)* 2012; [Acedido em 20 de Abril de 2013]. <http://www.ihmt.unl.pt/biblioteca/3Jornada/index.html>
- 41. Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM.** Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Sep 23];**4** (2):e 612. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

42. **Garcia JVS**. Contribuição para o conhecimento de Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): Aplicação de métodos de diagnósticos serológicos e molecular. *Dissertação de Mestrado em Saúde Tropicã*; 2011 **58**pp.
43. **Goarant C, Bourhy P, D'Ortenzio E, Darteyelle S, Mauron C, Soupé-Gibert ME, et al**. Sensitivity and Specificity of a New Vertical Flow Rapid Diagnostic Test for the serodiagnosis of Humana Leptospirosis *Plos NEGI Trop Dis* 2013; 7 (6)2289.
44. **Gonçalves ATS**. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009*; **114** pp.
45. **Guidugli F**. Prevenção e tratamento da Leptospirose Revisão Sistemática de ensaios Clínicos Aleatórios com Metanálises. *Dissertação / Pós-graduação em Medicina interna e terapêutica* S. Paulo. 2000; **101**pp.
46. **Haake DAM, Dundoo R, Cader BM, Kubak RA, Hartskeerl J, Sejvar J, et al**. Leptospirosis, Water sports, and Chemoprophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* 2002; **34**:40-4.
47. **Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA**. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* [Internet]. 2011 Apr;17(4):494– 501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414083>.
48. **Holt J, Davis S, Leirs H**. A model of Leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of

- rodent control. *Acta Trop.* [Internet]. 2006 Oct [cited 2013 Sep 23]; 99 (2-3):218–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996018>.
- 49. Homem VSF, Heinemann MB, Moraes 1ZM, Vasconcellos SA, Ferreira F e Neto JSF.** Epidemiologic study of bovine and human leptospirosis in eastern Brazilian Amazon. *Rev da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; **34** (2): 173-180.
- 50. Jougard SDD.** Diagnóstico de Leptospirose por PCR e Caracterização de isolados de *Leptospira spp.* por sequenciamento do 16S rDNA e análise VNT. *Tese de Graduação em Ciências Médica Brasil* 2005; **80** pp.
- 51. Katakweba AS, Mulungu KL, Eiseb SJ, Mahlaba AT, Makundi RH, Massawe AW et al.** Prevalence of haemoparasites, leptospires and coccobacilli with potential for human infection in the blood of rodents and shrews from selected localities in Tanzania, Namibia and Swaziland. *J. African zoology* 2012; **47**(1):119-127.
- 52. Kee SH, Kim IS, Choin MS, Chang WH.** Detection of Leptospiral DNA by PCR. *J. Clin Microbiol Washington*, 1994; **32**:(4)1035-1039.
- 53. Ko AI, Goarant C, Picardeau M.** Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* [Internet]. 2009 Oct [cited 2013 Sep 23]; 7 (10):736 – 47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 54. Krishna R, Maripandi A, Raja SS, Ponmurugan K, Sharma S, and Sreenivasan N.** Characterization of leptospiral isolates by using PCR-Restriction Fragment Length Analysis; *research Artig Indian J. Med. Microbiol.* 2008; (September) **20**:33-36.

55. Lee S V, Tai ES, Mutalib AR, Khairani-Bejo S, Bahaman AR. Rapid detection of pathogenic leptospires by lyophilized reagent-based polymerase chain reaction. *Trop. Biomed.* [Internet]. 2011 Dec; **28** (3):497–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433877>.
56. Léon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, André-Fontaine G. Identification of Pathogenic *Leptospira* Strains in Tissues of a Premature Foal by Use of Polymerase Chain Reaction Analysis. *J vet Diagn. Invest* 2006; **18**: 218-221.
57. Levett PN. Leptospirosis: Re-emerging or rediscovered disease? *J. Med Microb*, V,1999; **48**, (2) 417-418.
58. Levett PN. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* Washington, 2001a; **14**: (2) 296– 326.
59. Levett PN, Branch SL, Wittington CU, Eduards CN, Paxton H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clinical and Laboratory Immunology*, 2001b; **8**:349-351.
60. Lima HCAV. Incidência e Fatores de risco Associados às diferentes formas clínicas da Leptospirose: Um estudo de vigilância de base populacional em uma comunidade urbana de Salvador-Bahia. Salvador -Brazil; 2011. **67pp**.
61. Lima RDF. Estudo transversal das doenças abortivas de origem bacteriana no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, São Miguel, Açores. *Dissertação de Mestrado em saúde Pública e Veterinária; Lisboa* 2008; **133 pp**.
62. Machang'u R S, Mgone GF, Assenga J, Mhamphi G, Weetjens B, Cox C, et al. Serological and molecular characterization of *Leptospira* serovar Kenya from

- captive African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*) from Morogoro Tanzania. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2004; **41**: 117-121.
- 63. Machry L, Ribeiro RL, Vital-brazil JM, Balassiano IT, Cristina I, Oliveira M DE, et al.** Caracterização de cepas de referência de *Leptospira* sp utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis Characterization of *Leptospira* sp reference strains using the pulsed field gel electrophoresis technique. 2010; **43** (2): 166–9.
- 64. Martins FSV, & Catiñeiras TMPP.** Leptospirose. *Centro de informação em saúde para dos viajantes* 2009; [Acedido em 19 de maio 2013]; <http://www.cives.ufrj.br/informacao/leptospirose/lep-iv.html>.
- 65. Martínez P, Ortega D, y Salinas K.** Evolución de la Leptospirosis según el sistema de vigilância epidemiológica Nacional, Chile 2003-2009; *Rev.chil.infectol*, 2012; **29** (6):648-654.
- 66. Martini EZ y Pizarro PR.** Leptospirosis. Puesta al dia. *Rev Chil Infect*; 2007; **24** (3): 220-226.
- 67. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2219– 2224.
- 68. Merien F, Baranton G, Perolat P.** Comparison of Polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis*, 1995; **172**: 281-285.
- 69. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, et al.** A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Letts, Amsterdam* 2005; **249**: 139–147.

- 70. Mgone GF, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Hartskeerl R A.** New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* [Internet]. 2006 Mar [cited 2013 Sep 23]; **56** (Pt3):593–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16514033>.
- 71. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro A de Oliveira, Mendonça C, Victoria WB da silva.** Investigação soro epidemiológica de Leptospirose Canina na área Territorial urbana de Botucatu, São Paulo. *J. vet. Res. anim.* 2006; **43**:598-604.
- 72. Mohammed H, Nozha C, Hakin KRB. and Azis F.** Epidemiology of human Leptospirosis in Marroco. *Asis J.of Epidemiology* 2011; **4** (1):17-22
- 73. Monahan AM, Miller IS, Nally JE.** Leptospirosis: risks during recreational activities. *J. Appl. Microbiol.* [Internet]. 2009 Sep [cited 2013 Sep 23];107(3):707–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302325>.
- 74. Monteiro GR de Gois.** Efetividade da Doxiciclina na profilaxia contra a Leptospirose. Natal, 2003; **61** pp.
- 75. Noguchi H.** Spiriqueta icterohaemorrhagiae in America wild rats and its relation to the japonese and European strains, *JExp.Med*, 1917; **25**:755-763.
- 76. Oliveira SV, Arsky A de Lourdes N, Caldas EP.** Reservatórios animais de Leptospirose; *Artg. Rev.* 2013; **39**:9-20.
- 77. Organização Mundial de saúde ( OMS).** Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2011;(6):45–52.

- 78. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N.** The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* [Internet]. 2008 Jul [cited 2013 Sep 23];12(4):351–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055245>.
- 79. Pelissari DM, Maia-Elkhoury ANS, Arsky MDLNS, Nunes ML.** Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. *Epidemiol. e Serviços Saúde* [Internet]. 2011 Dec [cited 2013 Sep 23]; 20 (4): 565 –74. Available from: [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742011000400016&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000400016&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- 80. Picardeau M.** Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2013 Jan [cited 2013 Sep 20];43(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337900>.
- 81. Rafizah AAN, Aziah BD Azwany YN, Imran KNY, Rusli MA NM et al.** Risk factors of leptospirosis among febrile hospital admissions in northeastern Malaysia. *Prev. Med. (Baltim)*. [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Sep 23];57 Suppl:S11–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295174>.
- 82. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, et al.** Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008; **2**: 228.
- 83. Roach JM, van Vuuren M, Picard J A.** A serological survey of antibodies to *Leptospira* species in dogs in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* [Internet]. 2010 Sep;81(3):156–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247041>.

- 84. Rocha QMW, Pacheco LMM BP.** Perfil clínico-epidemiológico da leptospirose humana em Maceió , no Estado de Alagoas , Brasil *Clinical-epidemiological profile of human leptospirosis in Maceió , state of.* 2010;23–7
- 85. Romero EC, Blanco RM, Yasuda PH.** Aseptic meningites caused by leptospira spp diagnosed by polymerase chain reaction. *Mem Inso Oswaldo Cruz*, [internet]. 2010 Dec; **105** (8): 988-92. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122519>.
- 86. Romi MBQ, Barros S, Silva VCL, Santana VLA, Souza MA, Harrop MHV, et al.** Determinação de anticorpos anti- *Leptospira* spp . e anti- *Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no Estado de Pernambuco. 2013;
- 87. Rosário LA, Arencibia DF, Baptista N, Jirón W; Suárez YES, Infante JF.** Phenotypic and molecular characterization of *Leptospira* clinical isolations from the Republic of Nicaragua. *Vacci Monitor*; 2012; **21**(3): 6-12.
- 88. Saif A, Freaan J, Rossouw J, Trataris AN,** Leptospirosis in South Africa. *Journal. Vet Rev.* 2012; **79** (2).
- 89. Scolamacchia F, Handel IG, Fèvre EM, Morgan KL, Tanya VN BB de C.** Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Sep 23];**5** (1):e 8623. Availablefrom:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2809085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 90. Ren S-X, Fu G, Jiang X, Zeng R, Miao Y-G XH et al.** Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. 2003;422 (April), *NATURE/VOL 422*//[www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

- 91. Simon F, Morand G, Roche C, Coton T, Kraemer P FP-E et al.** Leptospirosis in a French traveler returning from Mauritius. *J. Travel Med.* [Internet]. 2012 [cited 2013 Sep 23]; **19** (1): 69–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221817>.
- 92. Soto RRM, Vasconcelos SA, Pinheiro SR, Bernarsi F CS.** Leptospirose suína. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, 2007; **74**:379 – 395.
- 93. Theuerkauf J, Perez J, Taugamoia A, Niutoua I, Labrousse D, Gula R, et al.** Leptospirosis risk increases with changes in species composition of rat populations; *J.Naturwissenschaften*; 2013; **100**: 385– 388.
- 94. Tilahun Z, Reta D, and Simenew K.** Global Epidemiological Overview of Leptospirosis. *Internationatl Journal of Microbiological Research* 2013; **4** (1): 09-15.
- 95. Toyokawa T, Ohnishi M and K.** Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* [Internet]. 2011 Jan; **9** (1):111–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23848450>.
- 96. Truong KN, Coburn J.** The emergence of severe pulmonary hemorrhagic leptospirosis: questions to consider. *Front. Cell.Infect. Microbiol* 1 2012; (**24**) 10: 3389.
- 97. Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, et al.** Risk Factors and Predictors of Severe Leptospirosis in new; Caledonia 2011. <http://www.plosntds.org/article/authors/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001991>
- 98. Urquhart AE, Lee MG, King SD, Terry SI.** Human leptospirosis infective serogroups and serotypes in Jamaica. *Int J Zoonoses* 1980; **7**: 44– 48.

- 99. Vieira ML.** Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas. *Dissertação de Doutoramento*, Universidade Nova de Lisboa, 2006; **301** pp.
- 100. Vieira A, Barros MSJ, Trindade CVL, Faria MJ, Freitas F.** Leptospirose Humana. Breves considerações a propósito de uma casuística; *Acta medic portuguesa*, 1999; **12**: 331-340.
- 101. Wasiński B, Sroka J, Wojcik-Fatla A, Zając V, Cisak E, Knap JFP, et al.** Seroprevalence of leptospirosis in rural populations inhabiting areas exposed and not exposed to floods in eastern Poland *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2012; **19**: 285-288.
- 102. WHO/ILS.** (World Health Organization/International Leptospirosis Society). Human Leptospirosis: *Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*, 2003; **122** pp.
- 103. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL.** Evaluation of a Commercial Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M antibody in diagnosis of human Leptospiral infection, *J. Clin Microbiol*, 1997; **35**: 1938-1942.
- 104. Yimer E, Koopman S, Messele T, Wolday D, Newayeslassie B, Gessese N et al.** Human leptospirosis, in Ethiopia: a pilot study in Wonji. *Ethiop. J. Heal. Dev.* [Internet]. 2004 Jun 4; **18** (1): 48–51. Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ejhd/article/view/9866>.
- 105. Zuerner RL, Alt D, Bolin CA.** IS 1533- Basead PCR assay for Identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars *J. Clin Microb*, 1995; **33**: 3284-3289.
- 106. Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC and OS.** A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK

cells, and reduces renal colonization. *Clin. Vaccine Immunol.* [Internet]. 2011 Apr [cited 2013Sep23];**18** (4): 684–91. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



## Parecer no 11-2012-TM Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Título do Estudo:** Contribuição para o conhecimento da seroprevalência da Leptospirose na Província da Huíla: rastreio serológico de utentes/doentes assistidos no Hospital Central Dr. A.A. Neto-Lubango (Angola)

**Investigadora principal:** Elsa Graciana Estanislau Ndeyanelao, sob orientação da Inv<sup>a</sup> Doutora Maria Luisa Vieira

**Objectivos do estudo:** Contribuir para o conhecimento da presença de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* na população humana de Lubango, Província da Huíla (Angola), e relacionar essa informação com os fatores ambientais envolventes, incluindo exposição da população a potenciais fontes de infeção pelo referido agente, nomeadamente, o contacto direto ou indireto com animais portadores de leptospiros (em particular, roedores) e ainda com ambientes contaminados pelas mesmas, tais como solo, água e até alimentos.

**Conflito de interesses:** Não parece existir conflito de interesses, apesar da investigadora trabalhar no local onde vai recolher os dados.

**Consentimento informado, informação para o participante:** Contemplado na descrição do projecto.

**Conclusão:** Consideramos que o estudo pode ser genericamente válido e justificado do ponto de vista ético.

Lisboa, 28 de Janeiro de 2013

Relatores:

Prof. Doutora Rosa Teodósio

Prof. Doutora Luzia Gonçalves





## ANEXO Ia



REPÚBLICA DE ANGOLA  
MINISTÉRIO DA SAÚDE

### COMITÉ DE ÉTICA

Parecer sobre o Protocolo de Investigação intitulado «Contribuição para o conhecimento da seroprevalência da Leptospirose na Província da Huíla: rastreio serológico de utentes/ doentes assistidos no Hospital Central Dr. A.A. Neto-Lubango (Angola)», solicitado a este Comité pela Dra. Elsa Graciana Estanislau Ndeyanelão, aluna do Mestrado em Ciências Biomédicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

Na apreciação do protocolo de investigação em referência, o Comité de Ética verificou que estão contemplados os aspectos éticos no que refere ao envolvimento dos participantes após consentimento informado, a garantia da assistência médica e medicamentosa e a confidencialidade dos resultados.

A investigação visa essencialmente fomentar informação que contribua para se ponderar sobre a inclusão de testes serológicos para a Leptospirose, como diagnóstico diferencial de outras patologias com síndrome febril, nomeadamente, malária, hepatite, meningite, insuficiência renal e febre tifóide, pelo que o Comité considera não haver inconveniente que se realize no País.

LUANDA, AOS 12 DE AGOSTO DE 2013.

A Coordenadora  
  
Dr.<sup>a</sup> Filomena Gomes da Silva  
“BIÓLOGA”



### A Informação prévia ao doente/utente sobre a Leptospirose

#### (Consentimento informado)

Aos doentes/utentes que reúnam os critérios de selecção foram dadas informações pela investigadora e/ou por outros profissionais de saúde do Hospital previamente envolvidos e preparados para colaborarem neste estudo as seguintes informações:

- A Leptospirose é uma infecção (doença) causada por uma bactéria (micróbio) que se encontra nos rins dos roedores (ratos/ratazanas/camundongos), estes são os principais transmissores destes micróbios que provocam a doença.
- Existe apenas uma espécie de leptospiras que habitualmente não causa doença. A doença apresenta sinais e sintomas como na malária (febre, cefaleia/ dores de cabeça, calafrios, mialgias (dores nos músculos) e na fase avançada icterícia (olhos amarelados) entre outros,
- O tratamento normalmente é possível e eficaz, (existe) quando se começa logo no início da doença, mas pode passar a uma fase crónica e grave (pior), esta ser mais difícil de tratar, e por não haver análises desta doença neste hospital o que impede de fazer o tratamento certo (na hora certa) para matar os micróbios que causam esta doença;
- Com este estudo pretende-se saber se existem estes micróbios (*Leptospiras*) na região, de modo a conseguir distinguir a doença que elas causam, de outras doenças existentes, que apresentam os mesmos sintomas (febre);
- Este estudo pretende recolher uma amostra de sangue (para análise no laboratório) de pessoas que recorrem (procuram) ao hospital, apresentando febre;
- Ao colaborar, estará a contribuir para um estudo que pretende melhorar o conhecimento sobre a doença causada por essa bactéria (micróbio) e contribuir para melhorar o seu tratamento;
- Ao confirmar-se a existência de *Leptospiras* nas amostras analisadas o Hospital criará condições para garantir o tratamento e acompanhamento aos doentes;

- Toda a informação fornecida será mantida anónima (segredo) e apenas o médico assistente e a Direcção geral do hospital terão o conhecimento dos resultados no sentido de poder vir a melhorar no futuro o diagnóstico e tratamento da doença;
- A participação neste estudo é voluntária, sendo que se não participar não tem qualquer prejuízo na assistência que lhe é prestada.

**Nota-**O impresso de consentimento informado foi apenas assinado pelo participante ou, tratando-se de crianças, pelo seu representante legal, se por outro motivo elementos de identificação, nomeadamente do profissional de saúde eram envolvidos na informação acima referida. Foi salvaguardada a possibilidade do participante que não sabe assinar pelo que foi disponibilizado uma almofada para a recolha de impressão digital.

Nº



**REPÚBLICA DE ANGOLA**  
**GOVERNO PROVINCIAL DA HUÍLA**  
**DIRECÇÃO PROVINCIAL DA SAÚDE**  
**HOSPITAL CENTRAL DR. ANTÓNIO AGOSTINHO NETO**

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

**"Contribuição para o conhecimento da sero-ocorrência da Leptospirose na Província da Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes/utentes assistidos no Hospital Central Dr A.A. Neto-Lubango (Angola) "**

Eu, abaixo-assinado(a), declaro ter compreendido a explicação que me foi fornecida acerca do estudo que se tenciona realizar sobre Leptospirose na Província da Huíla para o qual é necessário fazer uma colheita de sangue. Foi-me ainda dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento que a informação que me foi prestada e está de acordo com os objectivos do estudo, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto decorrente da 'picada' para a colheita de sangue. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que me é prestada.

Foram-me ainda dados os contactos da investigadora do estudo no caso em que haja dúvidas.

Por isso, consinto que seja realizado o estudo que me foi proposto e explicado.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / 201\_\_.

Assinatura do utente/doente (*ou do seu representante legal*)

Não sabe assinar

\_\_\_\_\_



Nº



**REPÚBLICA DE ANGOLA**  
**GOVERNO PROVINCIAL DA HUÍLA**  
**DIRECÇÃO PROVINCIAL DA SAÚDE**  
**HOSPITAL CENTRAL DR. ANTÓNIO AGOSTINHO NETO**

**LEPTOSPIROSE (DOENÇA DE WEIL)**

**INQUÉRITO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO NO HOSPITAL CENTRAL DO LUBANGO**

**Elaborado /ELSA G. E. NDEYANELAO**

**1- IDENTIFICAÇÃO DO DOENTE**

NOME \_\_\_\_\_

IDADE \_\_\_\_\_ GÉNERO \_\_\_\_\_

ESTADO CIVIL \_\_\_\_\_ TELEFONE \_\_\_\_\_

PROVENIÊNCIA/RESIDÊNCIA \_\_\_\_\_

PROFISSÃO/OCUPAÇÃO \_\_\_\_\_

LOCAL DE TRABALHO \_\_\_\_\_

CLASSIFICAÇÃO DO CASO: SUSPEITO \_\_\_ PROVÁVEL \_\_\_ CONFIRMADO \_\_\_

**2- INFORMAÇÕES CLÍNICAS / EXAME FÍSICO**

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS \_\_\_ EVOLUÇÃO (AGUDA , CRÓNICA )

SINAIS E SINTOMAS: FEBRE SIM , NÃO ... INÍCIO SÚBITO: SIM  NÃO

CEFALEIAS (DORES DE CABEÇA): SIM  NÃO

CALAFRIOS/ARREPIOS: SIM  NÃO ; DORES NAS ARTICULAÇÕES E MUSCULARES (MIALGIAS): SIM , NÃO ; EXANTEMA/MANCHA NO CORPO: SIM  NÃO

LOCAL \_\_\_\_\_

ICTERICIA/OLHOS AMARELADOS: SIM  NÃO

JÁ ESTEVE INTERNADO? \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES \_\_\_\_\_

MUDANÇAS DE HÁBITOS NOS DIAS EM QUE FICOU DOENTE: \_\_\_\_\_

VIAJOU: SIM  NÃO  NADOU (EM PISCINA COM ÁGUAS PARADAS) SIM  NÃO   
 RIACHOS \_\_\_\_\_ CONTACTO DIRECTO COM OS ANIMAIS? \_\_\_\_\_ QUAL \_\_\_\_\_ CONTACTO COM O SOLO HÚMIDO, ÁGUAS PARADAS OU DE ESGOTOS? SIM  NÃO  OUTRAS SITUAÇÕES \_\_\_\_\_

TOMOU ALGUM MEDICAMENTO ANTES DE VIR AO HOSPITAL? SIM  ; NÃO   
 QUAL \_\_\_\_\_ QUANTAS VEZES/DIA \_\_\_\_\_

ANTIBIÓTICOS \_\_\_\_\_ OUTROS \_\_\_\_\_

### 3- INFORMAÇÃO SOBRE CONDIÇÕES AMBIENTAIS E DE SANEAMENTO:

INUNDAÇÕES POR CHUVAS NA SUA AREA DE RESIDÊNCIA \_\_\_\_\_

SISTEMA DE ABASTECIMENTO E TRATAMENTO DE ÁGUA:

CONSUMO DE ÁGUA: TORNEIRA: SIM  NÃO

OUTRAS FONTES: SIM  NÃO  QUAL? \_\_\_\_\_

DESTINO E TRATAMENTO DE LIXO DOMÉSTICO:

DEPÓSITOS EM COTECNTORES

DEPÓSITOS AO LIVRE  OUTRAS

DESTINOS DE ÁGUAS RESIDUAIS: ESGOTOS  DRENAGEM AO AR LIVRE

OUTRAS

HÁ RATOS EM CASA? SIM  NÃO  , OU NA SUA PROXIMIDADE? SIM  NÃO

CONDIÇÕES DE SANIDADE HABITACIONAIS: CASA DE BANHO

LATRINA:  DEFECACÃO AO AR LIVRE  OUTRA SITUAÇÃO: \_\_\_\_\_

COMO E ONDE GUARDA OS ALIMENTOS CRÚS EM CASA: DESPENSA: SIM  NÃO

ALIMENTOS COZIDOS GILEIRA: SIM  NÃO  OUTRA SITUAÇÃO: SIM  .....:

NÃO  OUTROS DADOS \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_\_\_ ASSINATURA \_\_\_\_\_

OBRIGADA PELA ATENÇÃO DISPENSADA E RÁPIDAS MELHORAS.



**4--INFORMAÇÕES LABORATORIAIS (IHMT/UNL- LISBOA)**

**SERO-OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SENSU LATO**

MATERIAL BIOLÓGICO: SORO SIM  NÃO

SEROLOGIA – TÉCNICAS DE MACROAGLUTINAÇÃO E MICROAGLUTINAÇÃO (TAM)  
RESULTADOS (TITULO) \_\_\_\_\_

**ABORDAGEM MOLECULAR**

DETECÇÃO DE ADN -LEPTOSPÍRICO: SIM  NÃO

OUTROS DADOS \_\_\_\_\_

DATA \_\_\_\_\_

ASSINATURA \_\_\_\_\_



**Procedimento e materiais necessários à realização da Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto sobre a lâmina.)**

Este método baseia-se na observação de uma reacção antigénio-anticorpo sobre lâmina, após mistura do soro problema com antigénio inactivo, muito estável e híper-reactivo, visto ser constituído por uma ou mais estirpes isoladas localmente.

**Reagentes e material:**

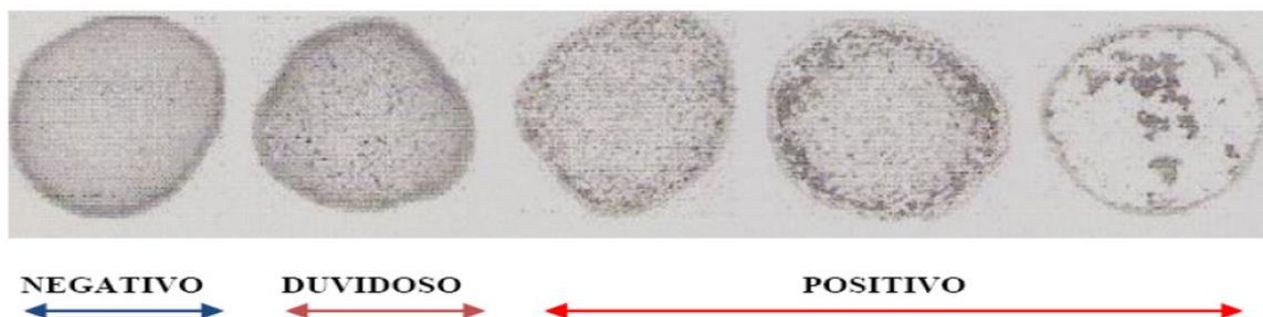
- Antigénio de *Leptospira interrogans* sensu lato (produzido pelo GLBL)
- Tampão PBS (0.01M, pH=7.2)
- Micropipetas de 5 a 50 µl e 200 a 1000 µl + pontas
- Controlo (positivo e negativo)
- Placas de vidro
- Pontas de plástico

**Procedimento:**

1. Agitar o soro problema.  
(usar uma ponta nova sempre que se troca de amostra)
3. Colocar 15µl de cada controlo, positivo e negativo, dos soros a analisar, na placa de aglutinação microscópica.
4. Colocar 15µl de suspensão antigénica homogeneizada sobre cada amostra a testar e controlos.
5. Agitar com a ponta, espalhando em círculos de  $\cong 15$ mm de diâmetro.
6. Agitar até 4 min, a 25rpm, ou manualmente.
7. Após agitação ler imediatamente contra um fundo escuro, usando uma fonte de luz oblíqua.
8. Classificar e registar a aglutinação como se segue:

| Resultados          | Aglutinações                   | Soro diluído (1:10) |
|---------------------|--------------------------------|---------------------|
| Positivo            | Muitas com grandes agregados;  | $\geq ++$           |
| Não Conclusivo (NC) | Leve e com pequenos agregados; | $\leq ++$           |
| Negativo            | Sem aglutinações               | -                   |

**NOTA:** O soro controlo positivo deve dar uma reacção ++++ no soro total e a 1:10.



9. Descartar as placas usadas para uma solução desinfectante.

10. Interpretação dos resultados:

**Fonte:** Protocolo adaptado pelo Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT) Junho-2012.

**Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) (em microplaca)**

(adaptado de Sulzer & Jones, 1980; Collares-Pereira, 1992; Faine *et al.*, 2000)

A técnica de aglutinação microscópica (TAM) é considerada a técnica de referência para o diagnóstico da leptospirose por ser a única que permite a identificação do serogrupos e da estirpe infectante.

**Objectivos:**

Diagnóstico imunológico de rotina, através da detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soros problema (humanos e animais).

Identificação dos anticorpos ao nível dos serogrupo reactivos.

**Protocolo em uso na GBLB /UEIMM/ IHMT**

Realiza-se em microplacas de fundo plano e baseia-se na reacção do soro problema previamente diluído (1:50), na fase de rastreio e, posteriormente, em diluições seriadas ao dobro (1:100, ... 1:2800), face aos antígenos vivos de referência mantidos em culturas. Recomenda-se ainda a utilização das estirpes isoladas localmente para além dos referidos antígenos representativos dos serogrupos patogénicos existentes, de forma a aumentar a sensibilidade do teste.

**Reagentes e equipamentos:**

- Antígenos vivos – culturas de 4 a 13 dias em meio líquido EMJH com uma densidade aproximada de  $2 \times 10^8$  células/ml, previamente examinadas em fundo escuro (**Tabela 1**)
- Tampão PBS ( pH 7,2 – 7,4 ) (Nota<sub>2</sub>)
- Microplacas de fundo plano
- Pipetas de Pasteur calibradas (1 gota  $\approx$  34 $\mu$ l)
- Micropipeta de 5 a 50  $\mu$ l e micropipeta multicanal

- Microscópio de fundo escuro com objectiva de longa distância focal (x20) para leitura directa das microplacas
- Estufa de incubação a 37° C

**Procedimento:**

1. Diluição preliminar dos soros a 1/50.
2. Marcação das microplacas com os antigénios, as diluições, o número dos soros problema e as testemunhas, de acordo com o seguinte esquema:

|                |        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|----------------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Diluição soros |        | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.      | Ag.       | Ag.       | Ag.       |
|                | SORO X | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> |
|                | 100    | <b>A</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | 200    | <b>B</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | 400    | <b>C</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | 800    | <b>D</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | 1600   | <b>E</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | 3200   | <b>F</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | ...    | <b>G</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |
|                | T      | <b>H</b> |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |

3. Distribuição do soro diluído nos poços (1 gota) por cada antigénio presente, na linha A e B.
4. Distribuição do tampão: 1 gota, do poço 2 até à linha da testemunha (inclusive).
5. Execução das diluições seriadas (1/200 a 1/3200), com o auxílio da micropipeta multicanal, transferindo sempre igual volume da diluição anterior até à última diluição, na qual este volume é desperdiçado.
6. Adição de igual volume de antigénio (1 gota) a todas as diluições a testar e à testemunha da respectiva coluna.
7. Agitar cuidadosamente e cobrir com tampa.

8. Incubar na estufa a 37° C, durante 2 horas.
9. Após a incubação, retirar as placas da estufa e observar directamente ao microscópio (adaptado com objectiva de longa distância focal) a existência de aglutinação, por comparação com a respectiva testemunha (controlo negativo)

### **Leitura das microplacas:**

A intensidade da aglutinação (**Fig. A.1.**) por campo de observação e por comparação com o respectivo controlo negativo, deve ser registada de acordo com o seguinte critério:

**4+** = 75% ou mais de bactérias aglutinadas;

**3+** = 50 a 75% de bactérias aglutinadas;

**2+** = 25 a 50% de bactérias aglutinadas;

**1+** = Pequenos aglutinados ocasionais;

**Negativo** = ausência de aglutinação, com número de células idêntico ao do controlo.

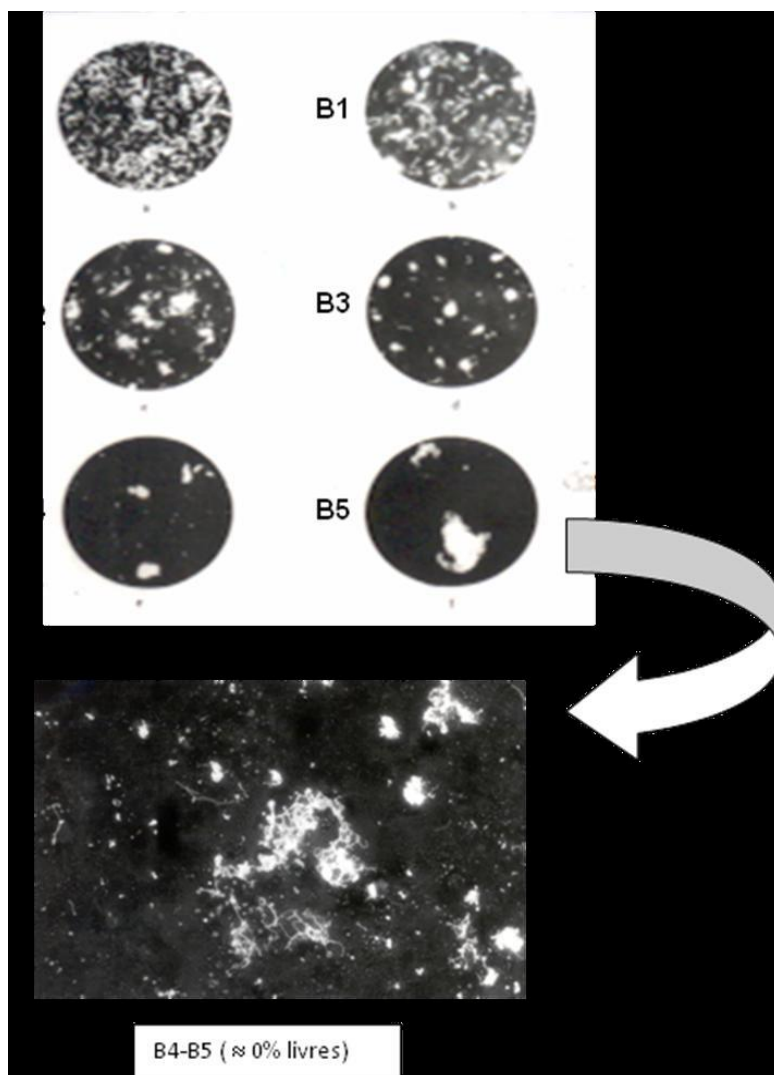
**Resultado: Considera-se a reacção positiva quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas, em regra, a partir da diluição mínima de 1/100.**

**Nota1:** Em virtude do aparecimento de imunoglobulinas IgM, na fase inicial da doença, seguido do aparecimento mais tardio de imunoglobulinas IgG, mais específicas, é conveniente basear o resultado serológico em amostras séricas emparelhadas, colhidas com um intervalo mínimo de 10 dias, sendo a primeira colheita efectuada de preferência na fase inicial da doença, de modo a poder analisar-se a cinética dos anticorpos específicos e, conseqüentemente confirmar o serogrupo presuntivo da estirpe infectante. Com efeito, a interpretação da serologia no início da doença pode ser dificultada pela existência de reacções cruzadas, paradoxais ou residuais, inerentes à detecção de antígenos comuns aos diferentes serovares (ditos “específicos de género”).

**Tabela-A.1.** Alguns antígenos de *L.interrogans s l* utilizados na realização do (TAM) existente na seroteca do Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (UEIMM/GLBL, IHMT)

| Serogrupos          | Serovares           | Estirpes        |
|---------------------|---------------------|-----------------|
| Semarang            | Patoc*              | PatocI*         |
| Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | RGA             |
| Icterohaemorrhagiae | Copenhageni         | Mus 20          |
| Pomona              | Mozdok              | 5621            |
| Canicola            | Canicola            | Hond Utrecht IV |
| Grippotyphosa       | Valbuzzi            | Valbuzzi        |
| Ballum              | Arborea             | Arborea         |
| Ballum              | Ballum              | Mus 127         |
| Panama              | Panama              | Cz 214          |
| Cynopteri           | Cynopteri           | 3522 C          |
| Tarassovi           | Tarassovi           | Mitis Jonhoson  |
| Sejroe              | Hardjobovis         | LELY 607        |
| Sejroe              | Hardjo              | Hardjoprajitno  |
| Sejroe              | Wolffi              | 3705            |
| Mini                | Mini                | Sari            |
| Javanica            | Poi                 | Poi             |
| Pyrogenes           | Pyrogenes           | Salinem         |
| Australis           | Bratislava          | JezBratislava   |
| Hebdomadis          | Hebdomadis          | Hebdomadis      |
| Celledoni           | Celledoni           | Clledoni        |
| Autumnalis          | Autumnalis          | Akiyami A       |
| Bataviae            | Bataviae            | Van Tienen      |
| Celledoni           | Celledoni           | Celledoni       |
| Louisiana           | Louisiana           | LSU 1945        |

\*Serogrupo saprófita (*L. biflexa sensu lato*)



**Figura A.1** Exemplo de uma aglutinação microscópica. A, Testemunha. B1-B5, intensidade crescente da aglutinação: B1 (75% livres), B2 (50% livres), B3 (25% livres), B4-B5 ( $\approx$  0% livres) (*Adaptado de Collares-Pereira, 1992*)

Os resultados foram definidos e fixados consoante a ultimo titulo observado na diluição final do soro para cada antigénio reactivo.

**Nota2 Composição do Tampão utilizado na TAM:**

\*Adaptação do *Laboratório de Leptospirose & Borreliose de Lyme* (UEIMM/GLBL, IHMT) Fevereiro 1998

**1-Tampão da TAM - Buffered salin solution:**

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| NaCl .....            | 15,64g (0,85%) |
| Tampão Sorensen ..... | 160 ml         |
| Água destilada .....  | 840 ml         |

Autoclavar a 120°C, 15´

**2 - Tampão Sorensen (solução Stock)**

|  |       |
|--|-------|
| Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> (anidro) ..... | 8,33g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....            | 1,09g |
| Água destilada .....                             | 1 L   |

pH = 7,6

Autoclavar a solução stock a 120°C, 15´

**3 – Meio EMJH (Difco™ Leptospira Medium Base)**

Preparação segundo as regras do fabricante:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Meio Base Difco ..... | 2,3 g  |
| Água destilada .....  | 900 mL |

Autoclavar a 121°C, 15'

Adicionar, em condições de assepsia, 100 mL de Leptospira Enrichment EMJH (Difco™).

pH final = 7,5



**Protocolo de Extracção e purificação de DNA (Kit Citogene®)**

**Objectivo:** Obter amostras de DNA de *Leptospira* spp com elevado grau de pureza

A extracção e purificação do DNA foi feita através do Kit “Citogene® Cell and Tissue a partir de 1ml de fluídos corporais. A utilização desse método foi executada em conformidade com as especificações do fabricante. Embora que tenham sido observadas pequenas alterações com maior particularidade o tempo de centrifugação e de secagem de *ependorfs*® para a evaporação total do etanol, estas ocorreram sempre na proximidade das normas estabelecidas pelo protocolo.

**Equipamento, reagentes e material (biológico e descartável):**

- Câmara de fluxo laminar
- Termobloco
- Vortex
- Centrífuga
- Micropipetas
- Soluções do Kit *Citogene*®
- Água autoclavada,
- Gelo
- Caixas de pontas estéreis com filtro
- Tubos *ependorf*® de 1,5 ml (estéreis)
- Cronómetro
- Soro problema (doentes)

**Descrição da técnica:****1-Etapa de lise celular**

Após a descongelação dos soros e homogeneização procedeu-se:

1-Adicionar 100ml de soro a um tubo contendo 500ml de **Cell Lysis**.

Resuspender várias vezes com a pipeta para lizar as células. Se a amostra contiver um elevado teor de proteínas, pode-se adicionar 0,5ml de fluído a 5,5ml de Cell Lysis

2- Aquecer a 65°C durante 15 min para completar a lise. Em alternativa, e para obter máximo rendimento, pode-se adicionar 3µl de **proteinase k (20mg/ml)** e incubar o lisado a 55°C durante 1 hora ou durante a noite

## 2- Etapa do Tratamento do lisado

Após a incubação:

- 1- Adicionamos 3µl de solução **RNase A** ao lisado celular.
- 2- Procedeu-se a mistura de amostra, invertendo o tubo 25 vezes e de seguida deixou-se a incubar a 37°C por 15- 60 minutos.
- 3- Após os 60 minutos, por nós optados deixa-se arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
- 4- Adiciona-se 200 µl de solução **protein precipitation** ao lisado.
- 5- Agitou-se no vortex a velocidade elevada durante 20 segundos para misturar uniformemente a solução **protein precipitation** com o lisado celular.
- 6- De seguida colocou-se no gelo durante 5-15 min
- 7- Centrifugar durante 5min a 14500 rpm para formar um *pellet* castanho de proteínas
- 8- Decantar o sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo de 1,5ml contendo 600 µl, de Isopropanol a 100% tendo o cuidado de não deixar ficar para trás o *pellet* castanho das proteínas. Neste passo o protocolo recomenda caso a amostra contenha um elevado teor de lípidos ou outras partículas que se acumulem no topo do líquido, transferir o sobrenadante usando uma pipeta, para que as partículas não sejam transferidas. Se o rendimento de DNA esperado for baixo (<20µg), adicionar glicogénio 1 µl de solução de glicogénio a 20 mg/ml, por cada 600 µl de isopropanol.
- 9- Misturar a amostra invertendo cuidadosamente 50 vezes e manter o tubo a temperatura ambiente pelo menos 5 min.
- 10- Centrifugar 5min a 14000rpm dependendo do rendimento, o DNA poderá ou não ficar visível, sob a forma de um *pellet* branco

- 11- Deitar fora o sobrenadante e escorrer com cuidado o tubo para o papel absorvente. Adicionar 600  $\mu$ l, de etanol a 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.
- 12- Centrifugar 1 min 14500rpm. Deitar fora o etanol com cuidado, pois o *pellet* pode estar solto.
- 13- Inverter e escorrer o tubo em papel absorvente e deixar secar ao ar livre durante 10-15.pelo protocolo, (mais por nos deixamos a evaporação do etanol por 1 hora).
- 14- Após a secagem adicionou-se 20.  $\mu$ l, de DNA Hydration e levar ao vortex 5 segundo para obter uma concentração aproximada de 200 $\mu$ g/ ml, para um rendimento aproximado de 20  $\mu$ g de DNA.
- 15- Incubar as amostras a 65°C durante 1 hora ou durante a noite à temperatura ambiente
- 16- Após isto recomenda-se guardar a 4°C, mais se for para guardar por longo período deve guardar então a -20°C ou -80°C.  
Para guardar poderá ser necessário uma breve centrifugação e seguida de uma transferência para um tubo de 1,5ml.  
Protocolo adaptado pelo Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT-UNL)



**RESULTADOS***(Continuação da tabela 3.7.)*

Resultados positivos nas duas técnicas (MACROLepto e TAM) (n=34 amostras)

**Tabela 3.7.** Caracterização de amostras positivas (n= 34) na MACRO e TAM *versus* dados epidemiológicos

|  |    |       |
|--|----|-------|
| <b>Destinos e depósito de lixo</b>                       |    |       |
| Ar livre   | 15 | 44,11 |
| Contentores  | 11 | 32,3  |
| Valas ou buracos   | 6  | 17,6  |
| Outros   | 2  | 5,8   |
| <b>Destinos de águas residuais</b>                       |    |       |
| Esgotos  | 7  | 26,4  |
| Vala/ buracos  | 9  | 26,4  |
| Ar livre   | 13 | 38,2  |
| Outras   | 5  | 14,7  |
| <b>Aprovisionamento/conservação de alimentos em casa</b> |    |       |
| Dispensa   | 13 | 38,2  |
| Geleira (Frigorífico)                                    | 21 | 61,7  |
| Outras   | 19 | 55,8  |



## Representação de alguns dos resultados de sequenciação (Stabvida®)

---

```
GGNNNNNTNGTCGCAGATGNGGNGNNAATTCACCNCATAGTTGTGCAANATAGCTTGTATATTG
TTCCGTCGACTAAACCGTCCGGCGCTTGTCTGGCTTACATATCCGTAATAGTTGATCACAG
ATCCATAGGGAAGGAACGTTTTTACGGTTTCGTTTGTCTGGAAGTGTGCTCTCGCTCAGAA
CAAAAGAGCTTTTAAGGCTTGGCAAACCACCGAACGCACCACAAGCGGTAATGCTTGCAA
```

*Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis (100%)

```
NNGGNNNCCTNNTGTCTAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGA
AACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGCCAGG
ACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCC
TGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTACCCCAACGCCGACAAGCTGCAAAGCTTGA
```

*Leptospira interrogans* serovar Balico (100%)

```
NNNNACNNACNTGCAGTNTGAANGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAA
ACGAAAACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAAGC
CAGGACAAGCGCCGGACGGTTTAGTCGATGGAAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGGA
TTCCTGCCGTAATCGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATTCACCAACAAGCTTAAAAGCTT
```

*Leptospira kirschneri* serovar Pomona (99%)

---

**Figura 3.16.** Sequências representativas de serogrupos/serovares obtidas do produto amplificado com os primers hap1 referentes a espécies genômicas de *Leptospira* presentes nos soros da população estudada.