



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Otimização de um protocolo de *Real-Time* PCR: deteção de
DNA de *Leptospira* spp em amostras biológicas e ambientais

Andreia Patrícia dos Santos Cavaleiro

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE TROPICAL

OUTUBRO, 2021



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Otimização de um protocolo de *Real-Time* PCR: deteção de
DNA de *Leptospira* spp em amostras biológicas e ambientais

Autor: Andreia Patrícia dos Santos Cavaleiro

Orientador: Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Investigadora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica (Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL)

Coorientador: Doutora Rosa Maria Figueiredo Teodósio, Professora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação em Clínica Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos à obtenção
do Grau de Mestre em Saúde Tropical

Otimização de um protocolo de PCR: detecção de DNA de
Leptospira spp em amostras biológicas e ambientais

Andreia Cavaleiro

Parte dos resultados decorrentes da presente Dissertação foram apresentados na Web Conference **MicroBiotec21:

- Andreia Cavaleiro, Maria Fernandes, Teresa Carreira, Rosa Teodósio e Maria Luísa Vieira. “*Optimization of a Real-Time PCR protocol using primers based on the lipL32 gene for Leptospira DNA detection in biological and environmental samples*”
- Maria Fernandes, Andreia Cavaleiro, Teresa Carreira, Rosa Teodósio, Maria Luísa Vieira. “*Presence of viable pathogenic leptospire in environmental samples from three districts of mainland Portugal: pilot study*”.

** Organização conjunta da Sociedade Portuguesa de Microbiologia (SPM) e Sociedade Portuguesa de Biotecnologia (SPBT) que decorreu em Lisboa de 23 a 26 de novembro de 2021 com o apoio Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

Quero começar por agradecer a todas as pessoas que me acompanharam nesta longa aventura, que foi fazer o Mestrado. Nunca foi um objetivo frequentar um Mestrado, porque aprendi, durante as Ciências Biomédicas e Laboratoriais, que estudar e trabalhar não era fácil. Requer espírito de sacrifício, trabalho, empenho e foco no objetivo. Hoje, tão perto do fim, e depois de um ano atípico, devido à pandemia, sinto-me realizada e mais rica.

Agradeço à Inv.^a Doutora Maria Luísa, por me ter recebido no seu laboratório, pelo tempo que disponibilizou para tirar todas as minhas dúvidas durante todo o processo da realização da dissertação, pela transmissão de conhecimentos e incentivos.

Agradeço à Prof.^a Doutora Rosa Teodósio, que me ajudou na escolha do tema para a realização da dissertação, quando eu estava e sentia-me completamente perdida. Por me ajudar a manter o foco durante a escrita, para que não sentisse, um dia mais tarde, a pressão e necessidade de escrever, porque havia uma data-limite para a entrega da dissertação.

Agradeço à Mestre Teresa Carreira, Técnica Superior de Laboratório por toda a sua disponibilidade, ajuda, transmissão de conhecimentos, pela sua enorme energia positiva e simpatia que foram fundamentais para a realização do trabalho laboratorial.

Agradeço à Mestre Maria Oliveira pelo meu envolvimento direto em parte do seu trabalho de Doutoramento, por partilhar os seus conhecimentos teóricos e práticos, e por me ajudar no trabalho laboratorial, mesmo depois dos seus longos turnos no seu trabalho profissional.

Agradeço à minha mãe pelas suas palavras de apoio a 100% quando lhe comuniquei que iria candidatar-me ao Mestrado, pela sua preocupação, por ouvir todos o meu desabafo quando estava mais desanimada e pela sua vontade em querer ver-me a defender a dissertação.

E por fim, agradeço aos meus amigos e colegas que tantos conselhos me deram sobre a escrita da dissertação, pela sua preocupação, pelas mensagens de apoio e pelo seu interesse em saber como estava a correr a escrita e quando terminaria esta etapa da minha vida.

Resumo

A leptospirose é uma doença zoonótica causada por bactérias (espiroquetas) do género *Leptospira*, que pode infectar os humanos e outros mamíferos. Os roedores são os reservatórios mais comuns das leptospirosas. Estas são transmitidas aos humanos pelo contacto direto com a urina, sangue, e outros tecidos infetados dos reservatórios colonizados ou animais infetados, ou indiretamente por água ou solo contaminados com estas bactérias. Assim, a leptospirose tem uma relação direta com condições precárias de saneamento e elevada infestação de roedores.

Este estudo teve como objetivo otimizar um protocolo de PCR em tempo real (qPCR), usando *primers* “LipL32” para deteção de DNA de *Leptospira* spp em amostras biológicas e ambientais. Para tal, foram selecionados quatro serovares representantes de duas espécies: *L. interrogans* (serovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni) e *L. borgpetersenii* (serovares Ballum e Hardjo) para a extração de DNA genómico. Os serovares foram mantidos em meio de cultura seletivo EMJH (*Ellinghaussen-McCullough-Johnson-Harris*) a 29°C e sob agitação permanente. As amostras biológicas a estudar foram as seguintes: *i*) amostras de soro (n=7) e urina (n=5) humanas; *ii*) sangue (n=3) e baço de roedores (n=3); e *iii*) amostras ambientais [solos (n=9) e águas (n=17)]. Os *primers* usados tiveram como alvo o gene *lipL32*, que codifica a lipoproteína da membrana externa com o mesmo nome (LipL32), que é responsável pela patogenicidade destas bactérias.

Inicialmente, o DNA genómico foi extraído das culturas puras (serovares) e das amostras biológicas. Foram realizadas diluições sucessivas de base 10 para a determinação do *Lower Limit of Detection* (LLOD). Este procedimento foi executado em triplicado de forma a aferir-se a reprodutibilidade do método. Foram usadas as culturas puras dos referidos serovares com diluições sucessivas de base 10 e amostras já testadas em estudos anteriores, e cujo resultado havia sido negativo. No teste de especificidade foi incluído um serovar saprófito (Patoc) da espécie *L. biflexa* e outras espécies de espiroquetas (*Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum*), e um protozoário do género *Leishmania*. O LLOD de DNA de *Leptospira* spp dos serovares foi determinado em 10⁰ GE/μl. Este DNA foi misturado com as diferentes amostras para determinar a sensibilidade do teste.

No teste de especificidade não foi obtida amplificação de DNA leptospírico. Em relação aos resultados obtidos na *nested*-PCR e na qPCR com o protocolo “LipL32”, foi observada amplificação de DNA em (10⁺/44; 22,7%) e (19⁺/44; 43,2%), respetivamente. Por outro lado, nas amostras (n=34; 77,3%) previamente estudadas pela *nested*-PCR sem amplificação de DNA de *Leptospira* spp, quando avaliadas pela qPCR (13⁺/34; 41,2%) mostraram amplificação de DNA leptospírico.

Estes resultados demonstraram que o protocolo de qPCR “LipL32” poderá ser útil na deteção de DNA leptospírico mesmo em baixas concentrações. Assim, a presente abordagem pode melhorar significativamente o diagnóstico laboratorial da leptospirose, principalmente na fase inicial da doença.

Palavras-chave: *Leptospira* spp, qPCR, *lipL32*, PMA.

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacteria (spirochetes) of the genus *Leptospira*, infecting humans and other mammals. Rodents are the most common reservoirs for leptospires. These bacteria are transmitted to humans through direct contact with urine, blood, and other tissues of colonized or infected animals, or indirectly by soils and freshwaters contaminated with these bacteria. Thus, leptospirosis has a direct relationship with precarious sanitation conditions and high rodent infestation.

This study aimed to optimize a Real-Time PCR (qPCR) protocol, using "LipL32" primers for DNA detection of pathogenic *Leptospira* species in biological and environmental samples. For this, we selected four serovars representing two species: *L. interrogans* (serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni) and *L. borgpetersenii* (serovars Ballum and Hardjo) for genomic DNA extraction. The serovars were maintained in selective culture medium EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) at 29°C and under permanent agitation. The biological samples to study were the following: *i*) human serum (n=7) and urine (n=5); *ii*) rodent tissues (n=3) and urine (n=3), and *iii*) environmental samples [soil (n=9) and freshwater (n=17)]. The primers targeted *lipL32* gene, encoding the outer membrane lipoprotein with the same name (LipL32), responsible for *Leptospira* virulence were used.

Firstly, genomic DNA was extracted from pure cultures (serovars) and biological samples. Serial ten-fold dilutions were performed to determine the Lower Limit of Detection (LLOD). This proceeding was executed in triplicate to get the reproducibility of the method. Serovars with serial ten-fold dilutions and samples tested in a previous study, whose result had been negative, were used. The specificity test included a saprophytic serovar (Patoc) of *L. biflexa* and other spirochetes species (*Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*) and one protozoan of the genus *Leishmania*. The LLOD of *Leptospira* DNA from serovars was determined at 10⁰ GE/μl. DNA was mixed with the different samples to determine the sensitivity of the test. Specificity test showed no leptospiral DNA amplification. Regarding the results of nested PCR and qPCR with the "LipL32" protocol, we observed DNA amplification (10⁺/44; 22,7%) and (19⁺/44; 43,2%), respectively. On the other hand, samples (n=34; 77,3%) previously studied by nested PCR without amplifying *Leptospira* DNA when evaluated by qPCR (13⁺/34; 41,2%) showed leptospiral amplification DNA.

These results showed that the "LipL32" qPCR protocol could be useful to detect leptospiral DNA even at low concentrations. Thus, this approach can significantly improve the laboratory diagnosis of leptospirosis, particularly in the early phase of the disease.

Keywords: *Leptospira* spp; qPCR; *lipL32*; PMA

Índice

Agradecimentos	v
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	xiii
I. Introdução	1
1. Principais características do Agente Etiológico.....	1
2. Reservatórios	2
3. Ambiente.....	2
4. Patogénese	3
4.1. Síndrome de Weil.....	4
5. Diagnóstico Laboratorial	5
5.1. Métodos Indiretos.....	6
5.1.1. Teste de aglutinação microscópica (TAM)	6
5.1.2. ELISA	6
5.2. Métodos Diretos.....	7
5.2.1. Exame microscópico em campo escuro.....	7
5.2.2. Cultura e Isolamento	7
5.2.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	8
6. Aplicação da PCR na deteção de DNA leptospírico.....	9
6.1. <i>Nested</i> -PCR.....	11
6.2. PCR em tempo real (qPCR) com a sonda TaqMan	11
6.2.1. Monoazida de Propídio.....	13
7. Gene <i>lipL32</i>	13
8. Questão de Investigação	14
9. Objetivo Geral.....	15
9.1. Objetivos específicos	15
10. Tipo de Estudo	15
II. Materiais e Métodos	16
1. Culturas puras de <i>Leptospira</i> spp.....	16
2. Amostras Biológicas	16
3. Extração de DNA.....	17

3.1. Extração de DNA genómico das culturas puras de <i>Leptospira</i> (serovares selecionados).....	17
3.2. Extração de DNA das amostras biológicas (sangue de roedores) e ambientais...	18
4. Amplificação de DNA	19
4.1. Protocolo <i>nested</i> -PCR “LipL32”	19
4.1.1. Eletroforese.....	22
4.2. Protocolo qPCR “LipL32”	23
4.3. Protocolo qPCR Actina	25
5. Determinação do <i>Lower Limit of Detection</i>	26
6. Teste de Sensibilidade	27
7. Teste de Especificidade	28
8. Teste de Viabilidade de <i>Leptospira</i> spp.....	28
9. Tratamento de dados	29
III. Resultados.....	30
1. Quantificação de DNA.....	30
1.1. Culturas puras de <i>Leptospira</i> spp.....	30
1.2. Amostras Biológicas e Ambientais	30
2. Amplificação de DNA leptospírico	32
2.1. Detecção de DNA leptospírico pela <i>nested</i> -PCR “LipL32”	32
2.2. Detecção de DNA leptospírico por qPCR “LipL32”	33
3. Teste de Sensibilidade	35
3.1. Determinação do <i>Lower Limit of Detection</i> nas culturas puras de <i>Leptospira</i> spp.....	35
3.2. Sensibilidade da qPCR	36
3.2.1. Sensibilidade do protocolo qPCR “LipL32” em amostras biológicas e ambientais	37
3.2.2. Sensibilidade do protocolo da qPCR Actina nas amostras biológicas	42
4. Teste de Especificidade	44
5. Teste de Viabilidade de <i>Leptospira</i> spp.....	44
IV. Discussão e Conclusões.....	47
V. Referências Bibliográficas.....	52
VI. Anexos.....	59
1. Anexo 1	59

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem de <i>Leptospira</i> em microscopia eletrónica (Fonte: Levett, 2001) .	1
Figura 2. Adolf Weil, pioneiro no conhecimento da leptospirose.....	5
Figura 3. Anel de Dinger (Fotografia cedida pela colega Márcia Sousa, e adaptada.)	8
Figura 4. Imagem da centrífuga utilizada - <i>Eppendorf® 5301 Concentrator</i> (Fotografia do Autor).....	19
Figura 5. Termociclador <i>MyCycler™ Thermal Cycler</i> (Fotografia do Autor).....	22
Figura 6. Fonte de alimentação de suporte à tina de eletroforese Bio-Rad <i>PowerPac™ 300</i> (Fotografia do Autor)	23
Figura 7. Equipamento Bio-Rad <i>CFX Connect™ Real-Time System</i> , utilizado na amplificação de DNA por qPCR (Fotografia do Autor).....	25
Figura 8. Equipamento utilizado para a quantificação de DNA para o teste de sensibilidade (<i>NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific</i>	27
Figura 9. Equipamento utilizado para o teste de viabilidade de leptospiras- <i>PMA- Lite™ LED Photolysis Device</i> (Fotografia do Autor).....	29
Figura 10. Representação da amplificação de DNA leptospírico das amostras humanas (soro e urina) pela técnica de <i>nested-PCR</i> . (M – Marcador molecular 1000 pb; 1 a 7 – amostras de soro; 8 a 12 – amostras de urina; P – controlo positivo; N1 e N2 – controlo negativo).....	32
Figura 11. Representação gráfica dos resultados obtidos em percentagem pela <i>nested-PCR</i> e qPCR no total de amostras estudadas	34
Figura 12. Representação gráfica dos resultados obtidos (em percentagem) pela qPCR nas amostras humanas (soro e urina).....	35
Figura 13. Representação gráfica da determinação do LLOD de culturas puras (serovares de duas espécies patogénicas de <i>Leptospira</i>) resultante da primeira amplificação, usando o protocolo de qPCR “Lipl32”.....	36
Figura 14. Representação gráfica da sensibilidade do protocolo de qPCR para os serovares em estudo de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.....	37
Figura 15. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de baço de roedores, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.	38
Figura 16. Representação gráfica da determinação sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras clínicas (soro), de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.....	39
Figura 17. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras clínicas (urina), de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.....	40
Figura 18. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de água, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.....	41
Figura 19. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de solo, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.....	42

Figura 20. Representação gráfica das amostras seleccionadas (a vermelho) para o teste de viabilidade.....	45
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1. Descrição da origem e número das amostras biológicas e ambientais utilizadas no estudo.....	16
Tabela 2. Quantidades usadas na <i>mix</i> , para a primeira amplificação	20
Tabela 3. Quantidades usadas na <i>mix</i> , para a segunda amplificação.....	21
Tabela 4. Condições utilizadas no protocolo <i>nested</i> -PCR “LipL32” para amplificação de DNA leptospírico	22
Tabela 5. Quantidades usadas para a produção da <i>mix</i> , para o protocolo qPCR “LipL32”	24
Tabela 6. Protocolo qPCR “LipL32”, com indicação das condições utilizadas para a amplificação de DNA por qPCR	25
Tabela 7. Quantidades usadas para a produção da <i>mix</i> , para o protocolo qPCR Actina.....	26
Tabela 8. Protocolo da reação de qPCR Actina com indicação das condições utilizadas	26
Tabela 9. Serovares de <i>Leptospira</i> spp e respetiva concentração de DNA	30
Tabela 10. Quantificação da concentração de DNA nas amostras humanas estudadas (soro e urina)	31
Tabela 11. Quantificação da concentração de DNA das amostras (sangue e baço) dos roedores	31
Tabela 12. Quantificação concentração de DNA das amostras ambientais (águas e solos).....	32
Tabela 13. Resultados percentuais obtidos nas amostras em estudo de acordo com a técnica realizada.....	33
Tabela 14. Resultados de sensibilidade obtidos no protocolo Actina	43
Tabela 15. Resultados do teste de especificidade, usando um protocolo com <i>primers</i> “LipL32”, para amplificação de DNA leptospírico	44
Tabela 16. Resultados do Teste de Viabilidade em amostras de água sujeitas a tratamento com PMA.....	45
Tabela 17. Representação dos resultados globais de todas as amostras em estudo de acordo com a técnica realizada	59

Lista de Abreviaturas

BHQ – Black Fole Quencher

Ct – Threshold Cycle

DNA – Deoxyribonucleic Acid (ADN - Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleótido fosfatado

EG – Equivalente Genómico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMJH- Ellinghausen-McCullough-Jonhson-Harris

g – grama

GE – Genomic Equivalence (Equivalente Genómico)

IgG- Imunoglobulina do tipo G

IgM- Imunoglobulina do tipo M

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

kDa - KiloDalton

LCR – Líquido cefalorraquidiano

Lig - Leptopiral immunoglobulin-like

LipL – Lipoproteína Lepto

LLOD - Lower Limit of Detection (Limite Mínimo de Detecção)

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – Micrometro

µM - Micromolar

min – minuto

ml – Mililitro

N – população

n - amostra

ng - nanograma

ND – Não Definido

NFQ – Non-Fluorescent Quencher

OMP – Outer Membrane Protein (Proteína da membrana externa)

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Par de Bases

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH – Potencial de hidrogénio

PMA - Monoazida de Propído

qPCR – Real Time PCR (Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real)

RNA – Ribonucleic Acid (ARN - Ácido ribonucleico)

rpm – Rotação Por Minuto

RT-PCR - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Transcrição
Reversa da Reação em cadeia da polimerase)

Seg. - segundos

ssp - Espécie

s.l. – Sensu lato

Taq – “Thermus Aquaticus”

TAM - Teste de Aglutinação Microscópica

Valor de p – Probabilidade de significância

U- Unidade

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UEI - Unidade de Ensino e Investigação

% - Percentagem

°C – Grau Celsius

I. Introdução

1. Principais características do Agente Etiológico

A leptospirose é causada por bactérias (espiroquetas)^[4] do género *Leptospira* (do grego “leptos” (fino) e do latim “spira” (enrolado) (**Figura 1**), que pertencem à Ordem Spirochaetales e à Família Leptospiraceae^[1, 3, 12]. As espiroquetas têm cerca de 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento. São bactérias gram negativas, obrigatoriamente aeróbias e crescem in vitro em meio de cultura ricos em ácidos gordos de cadeia longa (ex. Ellinghausen-McCullough-Jonhson-Harris) e a uma temperatura ótima entre 28° e 30°C ^[1, 4, 5, 12]. Apresentam uma morfologia espiralada e extremidades com forma em gancho ^[1, 2], o que lhes confere uma forma semelhante a um ponto de interrogação, sendo apenas visíveis em microscopia de fundo escuro, devido às suas diminutas dimensões ^[4]. São bactérias móveis, com três movimentos diferentes: rotação, progressivo e movimento circular. Atualmente, as leptospiras com base na classificação genética (molecular) dividem-se em três grandes grupos de espécies: patogénicas (10) intermédias (6) e saprófitas (7)^[47] em contraponto, ainda subsiste a classificação mais antiga, clássica designada por (fenotípica) que é baseada nas características antigénicas, dividindo o género *Leptospira* em duas espécies, uma patogénica *L. interrogans* com mais de 250 serovares conhecidos, e uma saprófita *L. biflexa* com cerca de 60 serovares.

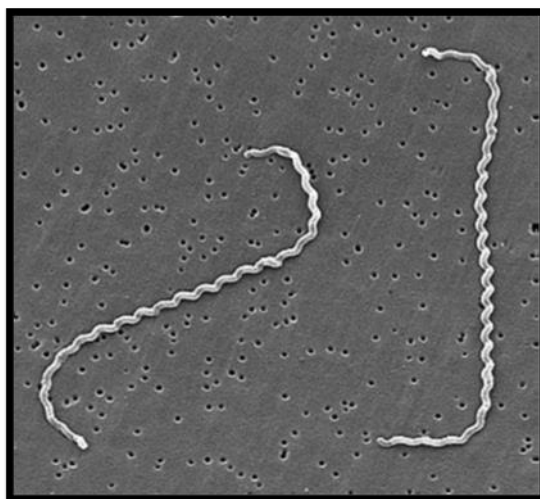


Figura 1. Imagem de *Leptospira* em microscopia eletrónica (Fonte: Levett, 2001)

2. Reservatórios

Os reservatórios mais importantes para a transmissão de leptospiros são os roedores (ratos, ratazanas e outros). De facto, os roedores vivem em permanente homeostasia com as referidas bactérias que vão eliminando no ambiente, através da urina, durante toda a sua vida. Acresce a esta particularidade o facto de estarem presentes quer em zonas urbanas quer rurais e, por vezes, muito próximos das populações residentes nos referidos espaços [7, 16], o que as expõe ao risco de contacto com estes agentes patogénicos. As leptospiros patogénicas vivem sobretudo na região proximal dos túbulos renais dos roedores (reservatórios), no entanto, outros órgãos podem servir de fonte de infeção [1, 4, 5, 16].

Os ratos “abrigam” assim, as leptospiros nos rins [1], sendo uma fonte de infeção para os humanos e outros mamíferos (cães, bovinos, equinos, entre outros). A excreção desta bactéria pode ser intermitente ou contínua, durante vários meses ou anos, as leptospiros não sobrevivem na urina ácida, mas permanecem viáveis na urina alcalina [1, 2, 16, 18].

Os roedores excretam as bactérias, através da urina, para o ambiente [16], onde conseguem sobreviver por um período de tempo que depende de vários fatores: da espécie (e até do serovar) e características do local (por exemplo: solo húmido e águas paradas e/ou correntes, além do valor de pH, que deve ser o mais neutro possível) [6, 7].

A infeção por *Leptospira* acontece, maioritariamente, em países tropicais e em desenvolvimento, e tem vindo a aumentar devido aos desastres naturais e a condições climáticas, existentes nestes locais, que levam a uma maior exposição humana a potenciais fatores predisponentes à transmissão de agentes causais de doenças [6, 7]. Os surtos de leptospirose ocorrem, essencialmente, durante períodos de chuva, inundações sazonais ou após eventos climáticos extremos [6].

3. Ambiente

Como referido anteriormente, as leptospiros são capazes de sobreviver durante um período de tempo no ambiente, pode ser desde horas a vários meses, porém não são capazes de se multiplicar no solo e na água. São vários os fatores que contribuem para o tempo de sobrevivência das bactérias no ambiente, como o pH (que variando entre 7,2 a

8,0 as leptospiras são viáveis durante meses), conteúdo orgânico, textura, salinidade, humidade do solo, temperatura (que quando baixas a sobrevivência das mesmas é mais prolongada) e a presença de outros microrganismos [5, 39]. Pensa-se que a expressão diferencial das várias proteínas, presentes na membrana externa, pode estar envolvida na adaptação, das referidas bactérias, ao ambiente como um organismo livre [16].

A leptospirose é uma doença sazonal, sendo no verão e no outono que se regista uma maior incidência de infeção com clima temperado, em países com clima tropical a elevada incidência ocorre no período das chuvas que causa a mobilização e dispersão de leptospiras, e levando à contaminação de solos e águas circundantes [3, 5].

Posto isto, o ambiente não é um reservatório do ponto de vista epidemiológico, mas um portador temporário da bactéria, que ajuda na sua disseminação e serve de ponte entre o reservatório e o hospedeiro [39]. É importante que realizar mais estudos sobre a capacidade de sobrevivência no ambiente (solo e água) nas várias estirpes, de modo a melhorar o controlo e prevenção da infeção no homem [40].

São poucos os estudos feitos à cerca da presença de leptospiras no solo, porém, nos estudos feitos até hoje relatam a presença de pequenas concentrações de leptospiras em solos [3]. São estas pequenas concentrações, no ambiente, que tornam possível que os humanos possam ser infetados de forma indireta, como é o caso dos veterinários, dos mineiros, dos pescadores, praticantes de desportos aquáticos e dos agricultores, sendo assim a leptospirose designada como uma doença ocupacional [5, 40].

É importante referir, que na Escócia, em Glasgow, foi relatado um surto de infeção de leptospirose em trabalhadores de saneamento (17%), que teve como consequência o reconhecimento de uma atividade de risco e posteriormente à criação de programas de controlo de roedores e ao uso de equipamentos de proteção, tendo como resultado a redução de casos de infeção. Outra causa que foi considerada como a diminuição da doença, foi a presença de detergentes nas águas residuais, levando à diminuição da sobrevivência das leptospiras nos esgotos [5].

4. Patogénese

A leptospirose é uma doença zoonótica e ocupacional [29], de grande importância a nível global, apesar de ser negligenciada muitas vezes. Esta doença afeta mais de um

milhão de pessoas por ano [1, 2, 3, 5]. É um problema de saúde pública, especialmente em países tropicais e subtropicais com alta pluviosidade e países em desenvolvimento com défice condições de saneamento básico [11].

Os humanos são hospedeiros acidentais que, quando entram em contacto com urina, água ou solo contaminados pelas referidas bactérias, podem infetar-se e contrair leptospirose. As bactérias penetram através da pele e das mucosas entrando, desta forma, para o organismo do hospedeiro. A leptospirose é, assim, uma doença de grande importância a nível global, apesar de, muitas vezes ser subdiagnosticada e, por consequência, também subnotificada [1, 3, 5]. Uma vez no organismo do hospedeiro, as bactérias alcançam a corrente sanguínea e de forma disseminar-se pelos vários órgãos, como os pulmões, fígado, rins e cérebro [4, 29, 30].

Os sintomas da leptospirose são idênticos aos da dengue, malária, gripe, síndrome hemorrágica pulmonar e outras doenças que partilham a seguinte sintomatologia: febre, cefaleias e mialgias, calafrios, entre outros sintomas [1, 6, 8, 11, 27]. A leptospirose na gravidez pode ter consequências como: a infeção intra-uterina e a morte fetal [1].

Na leptospirose podem identificar-se duas fases: fase septicémica aguda (três a sete dias), em que os sintomas são pouco precisos, porque confundíveis com outros associados a diversas doenças. Nesta fase, as leptospiras podem ser detetadas na corrente sanguínea, e depois o seu número começa a diminuir passando para a segunda fase, em que as bactérias são eliminadas da corrente sanguínea devido ao aumento dos anticorpos IgM. Assim, devido ao papel dos anticorpos, tem início a excreção das leptospiras a partir dos túbulos renais, levando à eliminação de leptospiras pela urina, o que ocorre, geralmente, a partir da segunda semana, após a infeção. Mas esta excreção pode prolongar-se por quatro a seis semanas, no entanto, nalguns casos, existem relatos da sua excreção durante vários meses [24, 25, 48].

4.1. Síndrome de Weil

A síndrome de Weil foi descrita pela primeira vez por um médico alemão Adolf Weil (**Figura 2**), na década de 80, é também conhecida por leptospirose ictérica, e é a forma mais grave da leptospirose. Esta é caracterizada sobretudo pela presença de icterícia, que também pode ser desenvolvida por outras patologias relacionadas com o

fígado, como as várias formas de hepatite. No entanto, também faz parte da sintomatologia a insuficiência renal e/ou hepática, hemorragias, conjuntivite, erupções cutâneas, comprometimento pulmonar, bem como a sintomatologia referida anteriormente. A taxa de mortalidade ronda entre os 5% e os 15%, sendo a insuficiência renal, insuficiência cardiopulmonar e a hemorragia generalizada as causas de morte [4, 5, 28, 29, 31].



Figura 2. Adolf Weil, pioneiro no conhecimento da leptospirose.
(Fonte: [https://www.wikiwand.com/en/Adolf_Weil_\(physician\)](https://www.wikiwand.com/en/Adolf_Weil_(physician)))

5. Diagnóstico Laboratorial

Dado que a leptospirose apresenta uma sintomatologia semelhante a outras patologias, como o dengue [16], torna-se importante a realização de exames laboratoriais para o diagnóstico diferencial [1]. O diagnóstico precoce é indispensável para se proceder ao início do tratamento adequado [9, 15, 27]. Existem vários métodos diretos e indiretos para proceder ao diagnóstico de leptospirose.

5.1 Métodos Indiretos

5.1.1. Teste de aglutinação microscópica (TAM)

O diagnóstico da leptospirose é, geralmente, realizado por meio de serologia através do teste de aglutinação microscópica (TAM) que, ainda hoje, é considerado o *gold standard* pela Organização Mundial de Saúde (OMS)^[4, 12, 16, 24, 27]. Permite a detecção de anticorpos específicos contra os serovares/estirpes patogênicas de *Leptospira*, geralmente detetáveis, nas amostras clínicas [soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR)] uma semana após os primeiros sintomas. Após a primeira semana de infecção os anticorpos do tipo M (IgM) podem ser detetados, atingindo o pico máximo na terceira ou quarta semana, altura em que estão presentes sobretudo os anticorpos do tipo G (IgG), os quais permanecem detetáveis por um longo período de tempo ^[4, 10, 12, 25, 29]. Este é um teste com boa especificidade e sensibilidade, no entanto, não é um teste que permite a identificação da espécie ^[4], mas é, no entanto, a única que permite conhecer o serogrupo da estirpe infetante.

O TAM requer uma equipa treinada para manter uma bateria de culturas vivas (serovares), exigindo todas as medidas de biossegurança por parte do laboratório, de modo a não constituir risco de infecção quer para o laboratório quer para os técnicos também a leitura e interpretação dos resultados é algo subjetiva, exigindo muita experiência por parte dos técnicos, a par da perícia na utilização da microscopia de campo escuro ^[27].

5.1.2. ELISA

A técnica ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um ensaio imunoenzimático, que permite a detecção de anticorpos específicos nas amostras clínicas ^[20], em que não é necessário que as bactérias (leptospiras) estejam vivas ^[1]. Os anticorpos específicos (IgM e IgG) podem ser detetados entre sete a 10 dias após o início dos sintomas, é um teste relativamente rápido (duas a quatro horas), em que não é necessário possuir experiência no diagnóstico de leptospirose para a realização do referido teste ^[22, 24].

A detecção de IgM e IgG dá uma informação sobre o estágio da doença, sendo que a detecção de IgM, na primeira semana, indica que a infecção é recente, e a detecção de IgG indica que a infecção é tardia [23, 24].

A detecção de anticorpos IgM é utilizado em vários laboratórios, sendo que este teste tem elevada sensibilidade nos primeiros dias da doença [21], em termos de detecção de anticorpos. É, no entanto, um teste pouco específico [19], mas com maior sensibilidade que o TAM. Assim, por ter uma sensibilidade reduzida, não é o mais recomendado para o diagnóstico definitivo de leptospirose, necessitando de um teste confirmatório, o TAM [1, 22]. Por outro lado, é uma técnica útil para a triagem e teste de rastreio (*screening*) em regiões com laboratórios mais limitados, e que não têm possibilidade de realizar outras técnicas de diagnóstico mais diferenciadas [24].

5.2. Métodos Diretos

5.2.1. Exame microscópico em campo escuro

Esta técnica permite a visualização das leptospiras, no sangue ou na urina, com recurso a um microscópio em campo escuro. Apesar de ser possível a visualização das referidas bactérias, esta técnica não é recomendada devido aos resultados falsos positivos e falsos negativos a que pode dar origem [5]. É uma técnica com baixa sensibilidade e especificidade, pois é necessário que as bactérias se encontrem intactas e viáveis, e em número elevado, para a sua correta visualização [28]. É também uma abordagem que exige muita experiência por parte do observador.

5.2.2. Cultura e Isolamento

A realização de diagnóstico com recurso a cultura, requer meios de cultura específicos e várias semanas de incubação, sendo que este tempo difere de acordo com o serovar de *Leptospira*, e a quantidade de bactérias existentes na amostra [29]. Este é um teste com baixa sensibilidade e resultados demorados, uma vez que o crescimento das leptospiras é lento e fastidioso [1, 4, 12]. As amostras de sangue e LCR podem ser usadas para cultura em meio seletivo nos primeiros sete a 10 dias da doença, e no caso de amostras de urina podem ser usadas na segunda e terceira semana da doença [4, 5].

O meio de cultura comumente usado é o EMJH, cujo nome teve origem em quatro investigadores que o sintetizaram e lhe deram o nome *Ellinghausen-*

McCullough-Jonhson-Harris. Para o isolamento, é usada a apresentação de EMJH semissólido. É um meio seletivo, com pH neutro (entre 6,8 a 7,4). O crescimento das leptospiiras *in vitro* ocorre em incubadora orbital, com uma temperatura entre os 28°C e 30°C e sob constante agitação [5, 12], podendo o tempo de incubação variar de 10 a 14 dias, até semanas ou meses até se conseguir obter isolamento bacteriano. Nos meios semissólidos, quando o crescimento atinge a densidade máxima, observa-se uma zona com uma turvação característica, situada abaixo da superfície do meio designado por anel de *Dinger*. A adição de antibióticos ao meio de cultura, usado para o isolamento de leptospiiras, é importante para que haja inibição do crescimento de microrganismos contaminantes [1, 5, 12].

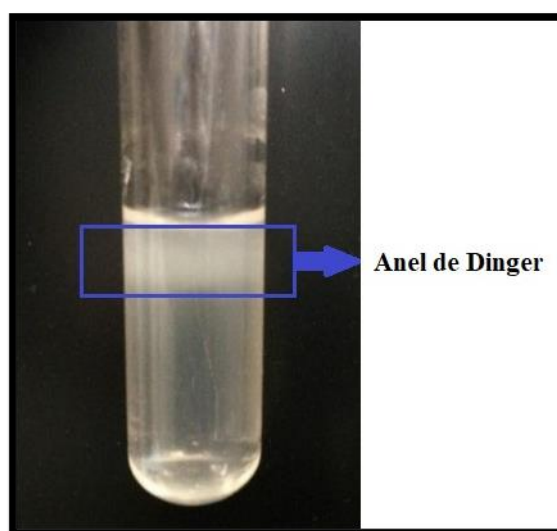


Figura 3. Anel de Dinger (Fotografia cedida pela colega Márcia Sousa, e adaptada.)

Este método de diagnóstico pode ser também usado para a vigilância ativa da presença de leptospiiras no ambiente, em caso de desastres naturais como inundações, ou simplesmente como controlo epidemiológico em diferentes períodos do ano [17].

5.2.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é um método direto e *in vitro* que tem como objetivo a amplificação de pequenas quantidades de fragmentos de ácidos nucleicos. Este método tem sido utilizado para a identificação de vários agentes etiológicos, como *Treponema pallidum* e *Borrelia burgdorferi*, através da amplificação de ácido desoxirribonucleico (ADN, ou DNA do inglês *Desoxyribonucleic Acid*) dos respetivos agentes etiológicos, e assim, obter-se o

diagnóstico de doenças infecciosas, como é o caso da sífilis e borreliose de Lyme^[13, 15, 9, 26]. A PCR tem sensibilidade e especificidade elevadas e, no que respeita à leptospirose é um teste mais rápido do que os métodos anteriormente referidos, sendo possível o diagnóstico precoce da infeção por *Leptospira* spp, permitindo assim começar o tratamento mais rapidamente ^[13, 14, 15, 19, 25, 26]. Por outro lado, é um teste bastante dispendioso, dado que necessita de equipamentos e reagentes específicos ^[28].

Para que se possa realizar a amplificação dos ácidos nucleicos é necessário proceder inicialmente à sua extração e purificação, nas amostras ^[26, 32]. No caso de casos suspeitos de leptospirose pode, por vezes, acontecer que não ocorra amplificação do DNA leptospírico, devido a fatores inibitórios presentes nas amostras clínicas, que impedem o processo de amplificação, como a presença de ureia, creatinina, derivados de hemoglobina e quantidades muito reduzidas de DNA de *Leptospira*. Também pode acontecer que a PCR dê falsos-positivos devido à contaminação da área de trabalho e/ou dos materiais e equipamentos utilizados no processamento da reação ^[29]. Por outro lado, resultados positivos na PCR, cujas amostras foram negativas na cultura, indicam a presença de DNA de *Leptospira* obtido, no entanto, de leptospiras não viáveis na mesma ^[14, 15], por outras palavras, para haver crescimento de leptospiras no meio de cultura, é necessário que as mesmas sejam viáveis e o inóculo seja suficientemente robusto. Outro motivo que leva a que o método anteriormente referido (cultura/isolamento), possa ter resultados negativos, e na PCR os resultados sejam positivos, é a toma de antibióticos antes da colheita da amostra destinada à realização do teste 'gold standard' que confirma o diagnóstico de leptospirose ^[19].

Com a PCR é possível diferenciar as leptospiras saprófitas das leptospiras patogénicas, consoante os *primers* utilizados e também pode ser usado em doentes que já tenham iniciado antibioterapia, fornecendo deste modo um resultado positivo, quando nos outros métodos de diagnóstico foi obtido um resultado negativo ^[5].

6. Aplicação da PCR na deteção de DNA leptospírico

A PCR foi desenvolvida nos anos 80, por Kary Mullis, e trouxe vários benefícios e desenvolvimentos científicos, como o sequenciamento e a expressão dos genes, para o estudo da genética molecular e o diagnóstico rápido de várias patologias ^[26].

A amplificação do DNA baseia-se na replicação semiconservativa, na qual as cadeias de DNA servem de modelo para a síntese de uma nova cadeia. Para tal é necessário utilizar uma *mix* (mistura), que torna possível a amplificação do DNA várias vezes, obtendo-se uma amplificação exponencial da amostra inicial com a utilização de um termociclador. A *Master Mix* é composta por água, *buffer* (tampão), desoxirribonucleótidos (ou desorribonucleótidos) fosfatados (dNTP's), *primers forward* e *reverse*, e Taq (*Thermus aquaticus*) Polimerase. O *buffer* garante a estabilidade do pH durante a reação, os dNTP's são nucleotídeos do DNA formados por uma base azotada, um açúcar e três grupos de fosfatos e a Taq Polimerase permite a replicação do DNA e é resistente ao calor, os *primers* são pequenas sequências (oligonucleótidos) complementares à região de DNA que se pretende amplificar [26, 32].

No termociclador a reação de PCR é dividida em três fases: fase de desnaturação, fase de hibridação e fase de alongamento, nas várias fases ocorrem variações nas temperaturas, que tornam possível a reação química desejada. Na fase de desnaturação pretende-se que ocorra a separação das cadeias de DNA, quebrando as ligações de hidrogénio; para este efeito a temperatura deve ser de 95°C, na fase de hibridação cujo objetivo é a ligação entre os *primers* complementares e as cadeias simples de DNA obtidas na fase anterior, sendo necessário a diminuição da temperatura, entre 40°C a 70°C, porque quanto mais alta a temperatura, mais seletiva e específica será a hibridação. A fase de alongamento tem como objetivo a síntese da cadeia complementar, a Taq Polimerase liga-se aos *primers* e catalisa a replicação usando os dNTP's [26].

O produto obtido da PCR pode ser detetado e analisado com recurso à eletroforese em gel de agarose ou acrilamida. O DNA torna-se visível, sob a forma de banda(s), quando exposto à luz ultravioleta, devido à sua ligação com um corante, como o *GreenSafe*[®], que se intercala entre as cadeias do DNA. Este corante é atualmente uma alternativa ao brometo de etídeo, por não ser mutagénico, cancerígeno e tóxico.

Como já foi referido anteriormente, a técnica de PCR pode ser útil para a deteção, de DNA leptospírico em amostras biológicas e ambientais na fase inicial da leptospirose, principalmente quando outros métodos de diagnóstico falham na deteção

de anticorpos, podendo ser uma alternativa ao TAM [19, 27]. O desempenho da PCR baseia-se na seleção de *primers* capazes de amplificar o fragmento pretendido [26].

Desde o desenvolvimento da PCR, a mesma obteve diversas variantes, PCR convencional, *nested*-PCR, PCR em tempo real (qPCR), PCR multiplex, RT-PCR (do inglês *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), entre outras [26].

6.1. *Nested*-PCR

A *nested*-PCR, é um método qualitativo, com sensibilidade superior à PCR convencional, uma vez que as amostras são amplificadas duas vezes, na qual a segunda amplificação é realizada com o produto proveniente da primeira amplificação. Porém, e visto que, são realizadas duas amplificações é uma técnica que está sujeita a contaminações. Outra vantagem deste método é que a 2ª PCR serve para confirmar a especificidade da primeira amplificação [46].

6.2. PCR em tempo real (qPCR) com a sonda TaqMan

A PCR em tempo real foi um progresso da PCR convencional, que trouxe a oportunidade de desenvolvimento de novas e importantes aplicações para a PCR em tempo real, juntamente oferece maior sensibilidade e precisão, e a possibilidade de monitorização da reação em tempo real, bem como a quantificação do produto final da PCR. Esta monitorização tem como benefício a determinação da quantidade de DNA inicial na amostra [32].

A PCR em tempo real necessita de sondas fluorescentes que quando se ligam ao DNA, imitem fluorescência. É através da fluorescência que sabemos a quantidade de DNA presente em cada ciclo da PCR, sendo este o motivo pela qual pode ser chamada de PCR quantitativo (qPCR).

O objetivo da qPCR é distinguir e medir com precisão os fragmentos específicos dos ácidos nucleicos nas amostras, mesmo quando esta quantidade é muito pequena. A qPCR amplifica o fragmento específico na amostra, e monitoriza o processo de amplificação usando o fluorocromo (sonda), a rapidez com que este se liga à sequência e imite o sinal está relacionado com a quantidade do fragmento específico inicial, permitindo a sua quantificação [32].

Para que seja possível a detecção da fluorescência é necessária a entrada de energia para a excitação do fluorocromo. Para tal o aparelho contém um termociclador acoplado a um sistema ótico que excita as moléculas de fluorocromo, ao mesmo tempo que lê a emissão de fluorescência [32]. Também é necessário um computador para a obtenção e análise dos resultados da PCR [26].

A sonda utilizada neste trabalho é a TaqMan, específica para o gene de interesse, que é duplamente marcada, possui um fluoróforo repórter (FAM) na extremidade 5' e um *quencher*, fluoróforo “silenciador” (BHQ – *Black Hole Quencher* ou NFQ – *Non-Fluorescent Quencher*), na extremidade 3'. O *quencher* tem como objetivo impedir que o fluoróforo repórter emita fluorescência, por conseguinte o fluoróforo repórter apenas é capaz de emitir fluorescência quando entra em contacto com o DNA, ou seja, quando as cadeias são separadas. Havendo fluorescência esta vai ser detetada e quantificada, demonstrando assim que está presente DNA na amostra [32, 33].

Assim sendo, a qPCR tornou-se o método de escolha para quantificar ácidos nucleicos em vários campos, como no diagnóstico, medicina veterinária, medicina forense, monitorização de tratamentos, etc.

Vantagens:

- Capacidade de quantificar os ácidos nucleicos;
- Para além da grande sensibilidade, consegue detetar pequenas quantidades dos fragmentos que se pretende amplificar;
- Não requer manipulações pós-PCR, como a PCR convencional, minimizando assim a probabilidade de contaminação ou erro humano.

As limitações que existem na qPCR são as mesmas que existem na PCR convencional:

- É possível as amostras biológicas possuírem compostos (como a hemoglobina ou ureia) que inibem a amplificação. Porém, é possível contornar esta limitação, usando polimerases de DNA alternativas, como Tfl (*T. flavus*), Pwo, etc., que são resistentes a inibidores específicos;

- O RNA (*ribonucleic acid*) é pouco estável, sendo necessário ter cuidado no seu isolamento para garantir a sua integridade e a remoção dos contaminantes.

No decorrer dos anos, muitos foram os estudos realizados com o uso da qPCR, que têm como alvo vários genes, sendo o gene *lipL32* importante para este estudo [32].

6.2.1. Monoazida de Propídio

O reagente Monoazida de Propídio (PMA) é um corante que se intercala na cadeia dupla de DNA. Para que o PMA chegue ao DNA é necessário que as bactérias tenham a membrana externa comprometida, permitindo a passagem do corante, e que este se ligue covalentemente ao DNA, quando exposto a luz halógena. Assim, as bactérias que estão viáveis, têm a sua membrana intacta e o DNA protegido.

O uso deste corante é relevante quando usado juntamente com a qPCR, porque impede que o DNA das bactérias não viáveis seja amplificado, ocorrendo a amplificação e quantificação do DNA das bactérias viáveis, sendo esperado que o Ct seja inferior quando comparado com as mesmas amostras que não foram tratadas com PMA, uma vez que este não permite a amplificação do DNA de leptospiros não viáveis.

Este é um método interessante quando usado em amostras ambientais, porque permite ter uma percepção da concentração de bactérias que podem infectar os humanos [39].

7. Gene *lipL32*

As proteínas da membrana externa (OMPs, do inglês *Outer Membrane Proteins*) presentes na superfície das leptospiros são importantes para a virulência das mesmas, dado que fazem a ponte de ligação entre estas espiroquetas e o hospedeiro. Assim, os genes *ligA*, *ligB*, *lipL41*, *lipL32*, *lipL21*, que codificam as OMPs com os mesmos nomes (LigA, LigB, ...) estão presentes nas leptospiros patogénicas, mas ausentes nas saprófitas, sendo por isso utilizadas para a deteção de infeção leptospírica, para a criação de vacina ou tratamento para a leptospirose [29, 35]. O gene *lipL32*, é disso exemplo, dado que está presente no genoma das espécies patogénicas de *Leptospira*, e codifica a lipoproteína LipL32, tendo um importante papel na patogenicidade destas bactérias.

A referida OMP (LipL32), é considerada uma das principais, senão a principal, lipoproteínas na membrana externa de espécies patogénicas de *Leptospira*, possui uma massa molecular de 32 kDa, sendo a lipoproteína mais abundante nas leptospiros patogénicas, representando cerca de 75% da membrana externa das mesmas [16, 37, 38, 42, 43]; é também altamente conservada nas várias espécies de leptospiros patogénicas [36, 38, 42, 43]. O gene que codifica a LipL32, assim como outros genes, estão altamente expressos nos hospedeiros humanos ou outras espécies de mamíferos, quando infetados por leptospiros, ou nas próprias leptospiros, quando mantidas em cultura (*in vitro*). Nos hospedeiros e até nos reservatórios a sua expressão ocorre dentro dos túbulos renais proximais [16, 42, 43] estimulando a excreção das bactérias para o ambiente. Nos humanos, ocorre a produção de anticorpos anti-LipL32 durante a infeção [16, 38, 42, 43]. Por este motivo o gene *lipL32* é um alvo ideal para a deteção molecular de leptospiros, diagnóstico e produção de novos tratamentos para a leptospirose, incluindo a produção de vacinas [38, 43, 44, 45]. Nos últimos anos, este gene tem sido muito utilizado na PCR, sendo conhecido pela sua grande sensibilidade e capacidade de fornecer um diagnóstico precoce da doença [28].

Além das amplificações de DNA leptospirico por PCR convencional e *nested*-PCR, o referido gene pode ser também detetado através da realização de um protocolo de qPCR, usando a sonda *TaqMan*. Este último é, ao contrário dos testes moleculares anteriormente referidos, um método quantitativo, rápido e muito sensível que pode ser usado com culturas puras de leptospiros patogénicas ou para amplificar DNA das referidas leptospiros em amostras clínicas (sangue total, soro, urina, entre outras) e em amostras ambientais ou provenientes de tecidos de outras espécies animais (ex. roedores). Em contexto de diagnóstico laboratorial, de acordo com o período de tempo em que tiveram início os sintomas da doença, deve optar-se pela amostra clínica mais indicada para ser colhida e testada, dado que, numa fase inicial, as leptospiros podem ser encontradas no sangue (fase de leptospiromia) e depois na urina, durante algumas semanas, no decurso da fase de leptospiuria [8].

8. Questão de Investigação

Qual o desempenho de um protocolo de qPCR, com *primers* “LipL32”, na deteção de *Leptospira* spp, em amostras humanas, de roedores e ambientais?

9. Objetivo Geral

Otimizar um protocolo de qPCR para a detecção de DNA de *Leptospira* spp em amostras biológicas e ambientais.

9.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- i. Proceder à extração de DNA de *Leptospira* spp em culturas puras e das amostras biológicas e ambientais;
- ii. Realizar um teste de sensibilidade, utilizando como amostras, culturas puras de serovares patogénicos de *Leptospira* com diluições sucessivas de base 10, e em amostras com resultado negativo, já testadas em estudos anteriores;
- iii. Determinar o *Lower Limit of Detection* (LLOD) de DNA leptospírico em culturas puras;
- iv. Realizar um teste de especificidade, utilizando um serovar de uma espécie saprófita de *Leptospira* e de outros microrganismos, incluindo também outras espiroquetas (ex: *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) e *Treponema pallidum*), e ainda um protozoário (ex: *Leishmania* spp);
- v. Proceder à detecção de DNA leptospírico em 10% do total das amostras (roedores e ambientais) de um projeto de investigação a decorrer na Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Microbiologia Médica, que suporta a realização de uma tese de doutoramento em curso no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme da referida UEI e algumas amostras biológicas existentes no IHMT e já previamente analisadas, e nas quais foi utilizado no âmbito desta dissertação um protocolo de qPCR específico para detecção de DNA de *Leptospira* spp;
- vi. Realizar um teste de viabilidade de *Leptospira* spp em amostras ambientais.

10. Tipo de Estudo

O tipo de estudo é classificado como estudo experimental, que inclui uma componente laboratorial que tem como objetivo a otimização de um protocolo de qPCR.

II. Materiais e Métodos

1. Culturas puras de *Leptospira* spp

Foram selecionadas duas espécies de leptospiros patogénicas, *L. interrogans* (serovares Copenhageni (M20) e Icterohaemorrhagiae (RGA); e da espécie *L. borgpetersenii* (serovares Ballum e Hardjo)), para a extração de DNA genómico. Qualquer destes serovares de *Leptospira* são, a par de outros, agentes causais de leptospirose humana e animal.

2. Amostras Biológicas

O material biológico usado neste trabalho foi constituído por: *i*) amostras humanas (soro e urina); *ii*) sangue e baço de roedores e, *iii*) amostras ambientais (solos e águas) (**Tabela 1**). Não foi necessário fazer a colheita de qualquer destas amostras, uma vez que já existiam no laboratório tendo já sido utilizadas anteriormente em contexto de investigação no âmbito de outros projetos. As amostras ambientais eram provenientes do distrito de Lisboa e Setúbal.

Procedeu-se à seleção aleatória de 10% de amostras de sangue e baço de roedores e igual percentagem para as amostras de água e de solo, e 30 % das amostras humanas (soro e urina) de um total de 39 amostras existentes no laboratório, em relação às quais o laboratório dispõe de autorização prévia (consentimento informado) pelos respetivos doentes para a sua utilização em posterior investigação. Para garantir a aleatoriedade da seleção das amostras foi usado o programa estatístico *Epitools* (<https://epitools.ausvet.com.au/randomnumbers>).

Tabela 1. Descrição da origem e número das amostras biológicas e ambientais utilizadas no estudo

<i>Amostras</i>	N	Percentagem a Estudar (%)	n	
<i>Roedores</i>	Sangue	30	10	3
	Baço	30	10	3
<i>Pacientes</i>	Soro	22	30	7
	Urina	17	30	5
<i>Águas</i>		173	10	17
<i>Solos</i>		97	10	9
Total		389	100	44

3. Extração de DNA

Para realização da extração de DNA dos serovares selecionados (culturas puras) de leptospiros (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*) e das amostras humanas e de roedores, foi usado o kit da *Citogene*[®] *DNA Cell & Tissue Kit*.

3.1. Extração de DNA genômico das culturas puras de *Leptospira* (serovares selecionados)

Adicionou-se o volume de 1000µl do meio de cultura ao *ependorf*[®] de 1,5ml e centrifugou-se a 13000g durante cinco segundos, para se obter um *pellet* de células. Removeu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células no vórtex. De seguida, adicionaram-se 600µl de solução *Cell Lysis*, lisando das células, e voltou-se a agitar no vórtex a alta velocidade.

Adicionaram-se, 3µl da enzima *RNAase* ao lisado, de seguida procedeu-se à inversão dos tubos 25 vezes e colocaram-se a incubar a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, colocaram-se os tubos a arrefecer à temperatura ambiente. E após o seu arrefecimento, adicionou-se um volume de 200µl de solução *Protein Precipitation* ao lisado celular, e voltou-se a agitar no vórtex a alta velocidade, de forma a garantir-se a correta homogeneização do lisado. De seguida os tubos foram a centrifugar a 13000g durante três minutos, para se formar um *pellet* de proteínas. Decantou-se o sobrenadante contendo DNA leptospírico para um novo *ependorf*[®] de 1,5ml contendo 600 µl de Isopropanol 100%, tendo o cuidado de eliminar as proteínas presentes. Procedeu-se à mistura da amostra invertendo-se cuidadosamente 50 vezes, seguida de uma centrifugação de um minuto a 13000g, obtendo-se um pequeno *pellet* branco de DNA genômico.

De seguida, descartou-se com cuidado o sobrenadante e escoou-se com cuidado para o papel absorvente. Posteriormente, adicionou-se um volume de 600µl de etanol a 70% e inverteu-se o tubo de forma a lavar o *pellet* de DNA. Seguidamente, centrifugou-se durante um minuto a 13000g, e descartou-se o sobrenadante com cuidado, para não se perder o *pellet*. Inverteu-se o tubo de forma a deixar escorrer o etanol para o papel absorvente, e levou-se a secar a vácuo durante 15 minutos.

Por fim, adicionaram-se 50µl de *DNA Hydration* e deixou-se a incubar *overnight*. No dia seguinte as amostras foram acondicionadas a 4°C até à sua utilização.

3.2. Extração de DNA das amostras biológicas (sangue de roedores) e ambientais

Primeiramente colocou-se um volume de 500µl do reagente *Cell Lysis* num *eppendorf*[®] de 1,5ml, seguidamente de 100µl de amostra. Para que fosse obtido um maior rendimento do DNA extraído, adicionou-se 1µl da enzima *Proteinase K*, e colocou-se a incubar a 55°C durante 1h, para que deste modo ocorresse a lise das células presentes nas amostras.

Após a incubação, adicionaram-se 3µL de enzima *RNAase* ao lisado, de seguida procedeu-se à homogeneização da solução, invertendo os tubos 25 vezes, de imediato, incubou-se a 37°C durante 20 minutos. Seguidamente, as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente durante 5 minutos após o que foram adicionados 200µl de *Protein Precipitation*, como o objetivo de precipitar as proteínas presentes nas amostras. De seguida as amostras foram homogeneizadas no vórtex durante 20 segundos; logo depois foram a incubar no gelo durante 15 minutos. Posteriormente foram centrifugadas durante 6 minutos a 14500rpm, obtendo-se o *pellet* e o sobrenadante, este último foi decantado para um novo *eppendorf*[®] contendo 600µl de Isopropanol a 100%. Para garantir um maior rendimento de DNA extraído, foi adicionado 1µl de glicogénio (*Thermo Scientific*) às amostras, de seguida procedeu-se à homogeneização cuidadosa, por inversão dos tubos (50 vezes), logo de seguida as amostras foram centrifugadas durante 6 minutos a 14500rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado com 600µl de etanol a 70%, inverteram-se os tubos diversas vezes para que a lavagem fosse mais eficaz. Seguiu-se uma nova centrifugação a 14500rpm durante dois minutos, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante, para que o *pellet* de DNA não se soltasse. De seguida os tubos foram colocados a secar, a vácuo, com o auxílio da centrífuga *Eppendorf*[®] 5301 *Concentrator* (**Figura 4**), durante 15 minutos. Depois, procedeu-se à eluição do DNA, adicionando-se 20µl de *DNA Hydration* e homogeneizou-se no vórtex, obtendo deste modo uma concentração aproximada de 200µg/ml, e um rendimento aproximado de 20µg de DNA. Posteriormente, as amostras

ficaram a incubar *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte as amostras foram armazenadas a 4°C até à sua utilização.

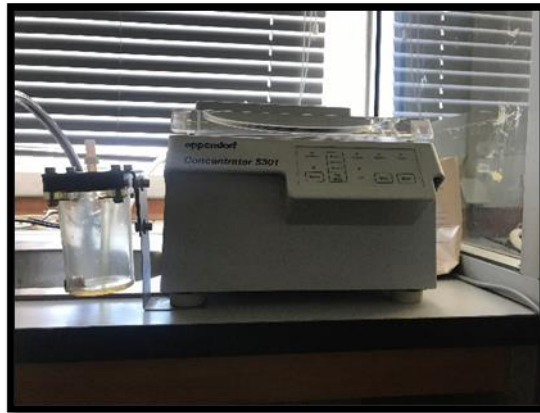


Figura 4. Imagem da centrífuga utilizada - *Eppendorf® 5301 Concentrator* (Fotografia do Autor)

A extração de DNA nas amostras de baço de roedores e nas amostras ambientais tinha sido previamente realizada num estudo anterior. Nas amostras de solo e para a extração do DNA foi utilizado o kit *Nzytech® NZY Soil and gDNA Isolation Kit*

4. Amplificação de DNA

4.1. Protocolo *nested*-PCR “LipL32”

Para a amplificação de DNA utilizou-se um protocolo de *nested*-PCR com *primers* “LipL32”, específicos para a deteção de leptospiros patogénicas.

Para a primeira reação de PCR foi preparada uma solução (*mix*), num *ependorf* de 2ml, para o volume final de 25µl, por cada amostra a ser testada. A *mix* continha: água, *Buffer*10x (NZYTech[®]), Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM (NZYTech[®]), dNTP Mix 40mM (Canvax Biotech S. L.), *primers* “LipL32” 100µM (Eurofins Genomics), “LipL32” F 5'- CGC TTG TGG TGC TTT CGG TGG T – 3' e “LipL32” R 5'– CTC ACC GAT TTC GCC TGT TGG G - 3' e *Taq Polimerase* 5U/µL (Bioline[®]) e 10µl de amostra, **Tabela 2.**

Tabela 2. Quantidades usadas na *mix*, para a primeira amplificação

Componentes da <i>mix</i>	Quantidades (μl)
Água	9,4
<i>Buffer</i>	2,5
Cloreto de Magnésio (MgCl₂)	1,25
dNTP Mix	1,25
“LipL32” F	0,2
“LipL32” R	0,2
<i>Taq Polimerase</i>	0,2
Amostra	10

Na segunda reação de PCR foi preparada a *mix* com os mesmos componentes descritos anteriormente para o mesmo volume final, 25 μ l. Porém, para a segunda reação foi usado 1 μ l do produto amplificado na primeira reação e 24 μ l da *mix*, sendo que os *primers* usados na *mix* foram “LipL32” 1, “LipL32” F 5’- TTC TGA GCG AGG ACA CAA TCC C – 3’ e “LipL32” R 5’– CTC CCA TTT CAG CGA TTA CGG - 3’, **Tabela 3.**

Tabela 3. Quantidades usadas na *mix*, para a segunda amplificação

Componentes da <i>mix</i>	Quantidades (μl)
Água	9,4
<i>Buffer</i>	2,5
Cloreto de Magnésio (MgCl₂)	1,25
dNTP Mix	1,25
“LipL32” F1	0,2
“LipL32” R1	0,2
<i>Taq Polimerase</i>	0,2
Amostra	1

Foi incluído um controlo negativo, contendo água ultrapura, e um controlo positivo preparado de uma cultura pura do serovar Hardjo da bateria de referência do Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme, existente no laboratório, para cada reação de PCR. A amplificação de DNA das duas reações do protocolo foi realizada no equipamento Termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler*, (**Figura 5**) este foi programado com as condições descritas na **Tabela 4**.



Figura 5. Termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler* (Fotografia do Autor)

Tabela 4. Condições utilizadas no protocolo *nested-PCR* “LipL32” para amplificação de DNA leptospírico

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5 min	1 x
Desnaturação	94	1 min	32 x
Emparelhamento	55	1 min	
Extensão	72	1 min	
Extensão Final	72	7 min	ND

ND: Não definido

4.1.1. Eletroforese

Após a realização da *nested-PCR*, para a análise dos produtos amplificados é necessário proceder à preparação de um gel de agarose, para a realização da eletroforese. Para esta preparação procedeu-se à montagem do suporte onde se coloca o gel de agarose. De seguida, procedeu-se à pesagem de 2g de agarose (NZYTech[®]) que se colocou num balão volumétrico de fundo plano, com 100ml de solução TAE (1x). Seguidamente a solução foi colocada no micro-ondas para ajudar a dissolver a agarose. Retirou-se do micro-ondas a solução e deixou-se arrefecer um pouco, tendo depois sido adicionado 2µl de corante GreenSafePremium™ (NZYTech[®]) e voltou-se a

homogeneizar. Por fim, verteu-se o gel de agarose para o suporte e deixou-se polimerizar.

Após a polimerização do gel de agarose, retirou-se o pente, e colocou-se o suporte com o gel na tina de eletroforese. Procedeu-se então à colocação dos produtos de amplificação em cada poço do gel, e também do marcador de DNA, *EZ Load™* 20pb (20-1000pb) *Molecular Ruler* (Bio-Rad), 2µl. A eletroforese decorreu durante 30 minutos a 125 volts, com o auxílio da fonte de alimentação Bio-Rad *PowerPac™* 300 (**Figura 6**).



Figura 6. Fonte de alimentação de suporte à tina de eletroforese Bio-Rad *PowerPac™* 300 (Fotografia do Autor)

Após a eletroforese, o gel foi observado sob luz ultravioleta (UV), com recurso a um equipamento com software de processamento de imagem, modelo *Dolphin-DocGel Imagem System*, da *Wealtec®*.

4.2. Protocolo qPCR “LipL32”

No âmbito da amplificação de DNA de *Leptospira* spp foi ainda utilizado um protocolo de qPCR também como anteriormente referido, com *primers* “LipL32”, específicos para a deteção de leptospiros patogénicas.

Para a execução do protocolo qPCR foi preparada uma solução (*mix*), num *eppendorf* de 2ml, para o volume final de 10 μ l, por cada amostra a ser testada. A *mix* continha: água, PerfeCTa[®] MultiPlex qPCR ToughMix[®] 5x (Quantabio), sonda LipL32-189P 5'-[FAM] A AAG CCA GGA CAA GCG CCG [BHQ1] - 3' (Eurofins Genomics) e *primers* “LipL32” (Eurofins Genomics), “LipL32” -45F 5'- A AGC ATT ACC GCT TGT GGT G-3' e “LipL32” -286R 5'- G AAC TCC CAT TTC AGC GAT T - 3', as quantidades usadas estão apresentadas na **tabela 5**. A sonda e os *primers* usados neste estudo, foram previamente descritos por Bourhy e colaboradores [48].

Tabela 5. Quantidades usadas para a produção da *mix*, para o protocolo qPCR "LipL32"

Componentes da <i>mix</i>	Volume (μl)
Água	5,1
PerfeCTa[®] MultiPlex qPCR ToughMix[®]	2
Sonda “LipL32” -189P	0,132
“LipL32” -45F	0,4
“LipL32” -286R	0,4
Amostra (<i>template</i>)	2

Após a preparação da *mix*, a mesma foi distribuída pelos vários poços da placa, seguida das amostras. Foi usado um controlo negativo e positivo para cada reação de PCR. A amplificação do DNA foi realizada no equipamento Bio-Rad CFX *Connect*[™] *Real-Time System* (**Figura 7**), tendo este sido programado com as condições descritas na **Tabela 6**, e de acordo com o protocolo descrito por Stoddard^[8].



Figura 7. Equipamento Bio-Rad CFX *Connect*[™] *Real-Time System*, utilizado na amplificação de DNA por qPCR (Fotografia do Autor)

Tabela 6. Protocolo qPCR “LipL32”, com indicação das condições utilizadas para a amplificação de DNA por qPCR

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Pré-Incubação	95	8 min	45x
Amplificação	95	3 seg	
	72	20 seg	
Alongamento	45	90 seg	1x

4.3. Protocolo qPCR Actina

Por forma a demonstrar, no teste de sensibilidade, que estava presente DNA genómico humano e animal, foi realizado um protocolo de qPCR com *primers* “Actina”.

Para a execução do mesmo, foi preparada uma *mix*, num *ependorff* de 2ml, para o volume final de 10 µl, por cada amostra a ser testada. A *mix* continha: água, PerfeCTa® MultiPlex qPCR ToughMix® (Quantabio), sonda beta-actin 5'- TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC ATC - 3' (Eurofins MWG Operon) e *primers* Beta-actin (Eurofins MWG Operon), Beta-actin F 5'-GGC TCY ATY CTG GCC TC-3' e Beta-actin R 5'- GCA YTT GCG GTCG SAC RAT G- 3' (**Tabela 7**). De seguida, a *mix* foi distribuída pelos vários poços da placa, seguida das amostras (templates).

Tabela 7. Quantidades usadas para a produção da *mix*, para o protocolo qPCR Actina

Componentes da <i>mix</i>	Volume (μl)
Água	5,1
PerfeCTa® MultiPlex qPCR ToughMix®	2
Sonda Beta-Actin	0,132
Beta-Actin F	0,4
Beta-Actin R	0,4
Amostra (<i>template</i>)	2

A amplificação foi realizada no equipamento Bio-Rad CFX *Connect*TM *Real-Time System*, este foi programado com as condições descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Protocolo da reação de qPCR Actina com indicação das condições utilizadas

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Pré-Incubação	95	3 min	ND
Amplificação	95	15 seg	45x
Alongamento	62	40 seg	

ND: Não definido

5. Determinação do *Lower Limit of Detection*

O *Lower Limit of Detection* (em português Limite Mínimo de Detecção) é a concentração de DNA que é possível ser detetada com segurança. Por forma a determinar o LLOD, procedeu-se à extração de DNA genómico das culturas puras de serovares patogénicos de *Leptospira* (*Icterohaemorrhagiae*, *Ballum*, *Copenhageni* e *Hardjo*), conforme descrito em 3.1.. De seguida fizeram-se diluições sucessivas de base 10. Este processo foi executado em triplicado, para a obtenção da média dos resultados conseguidos, e em dois momentos diferentes, de forma a aferir-se a reprodutibilidade do método. Assim, foi possível determinar o número de bactérias que se consegue detetar

com precisão, presentes no DNA leptospírico pela qPCR, e que é passível de ser amplificado.

6. Teste de Sensibilidade

Para a realização do teste de sensibilidade foram também usadas culturas puras de serovares patogénicos de *Leptospira* com diluições sucessivas de base 10, e ainda amostras já testadas em estudos anteriores e cujo resultado foi negativo.

Foram produzidos seis *pools*, de soro e urina humanos, assim como de sangue e tecido do baço de roedores, e ainda de águas e solos, previamente testadas e conhecidas por não conterem DNA de *Leptospira* spp. O objetivo dos *pools*, compostas por cinco amostras, foi aumentar a concentração de DNA das mesmas. Para a quantificação de DNA, das amostras e das culturas puras, foi usado o equipamento *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* da *Thermo Fisher Scientific* (**Figura 8**).

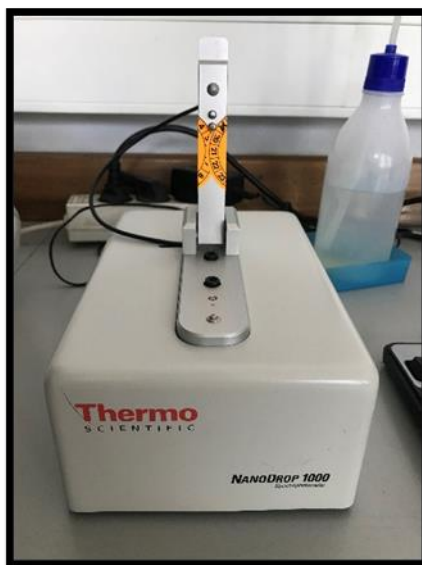


Figura 8. Equipamento utilizado para a quantificação de DNA para o teste de sensibilidade (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* da *Thermo Fisher Scientific*)

Procedeu-se à mistura dos *pools* com as culturas puras, 25 μ l de *pool* e 25 μ l de cultura pura, obtendo-se um volume final de 50 μ l. A partir deste volume foram realizadas diluições sucessivas de base 10, e para cada diluição foi executado o protocolo de qPCR “LipL32” em triplicado.

De modo a demonstrar que nestes *pools* existe DNA genómico humano e animal nas amostras usadas, foi realizado o protocolo de PCR Actina com *primers* que detetam o gene da proteína Actina, funcionando deste modo como um controlo endógeno.

7. Teste de Especificidade

Para a realização do teste de especificidade foram usados o serovar Patoc, representante de uma espécie saprófita (*Leptospira biflexa*) e ainda outros microrganismos, incluindo também os espiroquetídeos *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) e *Treponema pallidum* e ainda um protozoário do género *Leishmania*.

Foi feita a extração de DNA dos referidos microrganismos conforme descrito no ponto 3.2. e posteriormente foi realizado o protocolo qPCR “LipL32” descrito em 4.2.

8. Teste de Viabilidade de *Leptospira* spp

A seleção das amostras para a realização do teste de viabilidade, tem por base o critério de resultados anteriores terem sido positivos quer no teste *nested*-PCR e qPCR.

Para a execução do teste de viabilidade de *Leptospira* spp, foi necessário realizar uma pré-centrifugação das amostras, durante dois minutos a 4000rpm. Posteriormente, foram pipetados 500µl de amostra para um *eppendorf* de 1,5ml; no qual foi adicionado 1,25µl de PMA™ Dye (Biotium), após prévia centrifugação deste a 5000 rpm, durante dois minutos.

De seguida, os tubos foram incubados na ausência de luz, durante cinco minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram expostos à luz durante 15 minutos, no equipamento PMA-Lite™ LED *Photolysis Device* (**Figura 9**), para que o PMA se ligasse ao DNA das bactérias não viáveis.



Figura 9. Equipamento utilizado para o teste de viabilidade de leptospiros- PMA-Lite™ LED *Photolysis Device* (Fotografia do Autor)

Posteriormente, foi necessário proceder à centrifugação das amostras, à velocidade máxima durante cinco minutos, e imediatamente a seguir procedeu-se à extração do DNA das amostras em estudo, conforme foi descrito em 3.2, e por fim realizou-se a amplificação do referido DNA como detalhado no ponto 4.2.

9. Tratamento de dados

Os resultados obtidos são apresentados em tabelas e gráficos.

Para comparar os dois protocolos “LipL32”, *nested-PCR* e qPCR, foi usado o teste Qui-Quadrado tendo sido adotado o nível de significância estatística de $p < 0,05$, através do programa estatístico *Epitools* (<https://epitools.ausvet.com.au/comparetwotests>).

III. Resultados

1. Quantificação de DNA

1.1. Culturas puras de *Leptospira* spp.

A concentração obtida após a extração do DNA das culturas puras medidas no *NanoDrop*TM 1000 *Spectrophotometer* da *Thermo Fisher Scientific* está representada na **Tabela 9**.

Tabela 9. Serovares de *Leptospira* spp e respetiva concentração de DNA

Serovares de <i>Leptospira</i> spp	Concentração (ng/ μ l)
Copenhagení (M20)	25,3
Hardjo	11,7
Icterohaemorrhagiae (RGA)	23,4
Ballum	41,3

1.2. Amostras Biológicas e Ambientais

Nas **Tabelas 10, 11, 12**, registam-se as concentrações de DNA obtidas, após a respetiva extração das amostras biológicas e ambientais, e que foram medidas no *NanoDrop*TM 1000 *Spectrophotometer* da *Thermo Fisher Scientific*.

A concentração de DNA das amostras de soro e de urina (amostras humanas) mostrou resultados diferentes. No soro obtiveram-se valores de DNA entre os 40 ng/ μ l e o 70 ng/ μ l, enquanto que nas amostras de urina foi obtida uma concentração entre os 2 e os 20 ng/ μ l.

Tabela 10. Quantificação da concentração de DNA nas amostras humanas estudadas (soro e urina)

Amostras Soro/Ano	Concentração de DNA (ng/μl)	Amostras Urina/Ano	Concentração de DNA (ng/μl)
1/2018	40,3	30/2017	15,2
18/2018	46,8	23/2017	18,9
32/2018	61,5	19/2017	8,4
9/2018	46,6	14/2017	5,8
3/2018	49,1	13/2017	2,3

Por seu turno, e de acordo com a **Tabela 11**, as concentrações de DNA das amostras de sangue e de baço de roedores, foram mais elevadas neste último órgão.

Tabela 11. Quantificação da concentração de DNA das amostras (sangue e baço) dos roedores

Sangue (Roedores)	Concentração de DNA (ng/μl)	Baço (Roedores)	Concentração de DNA (ng/μl)
17	116,5	91	4398,5
33	129,9	99	196,5
41	116,5	115	163,8
49	131	123	87,1
57	217,7	147	581,7

Também foram obtidas as concentrações de DNA nas amostras ambientais (águas e solos), sendo que a quantificação realizada mostrou valores mais elevados nas amostras de solo.

Tabela 12. Quantificação concentração de DNA das amostras ambientais (águas e solos)

Águas	Concentração de DNA (ng/μl)	Solos	Concentração de DNA (ng/μl)
189	7,9	91	22,45
190	16,1	92	21,5
191	8,8	93	26,7
192	14,7	96	53,55
193	5,5	97	128,95

2. Amplificação de DNA leptospírico

Foi testado um total de 44 amostras com os protocolos *nested*-PCR “LipL32” e qPCR “LipL32”, cujos resultados obtidos encontram-se descritos no **Anexo 1**.

2.1. Detecção de DNA leptospírico pela *nested*-PCR “LipL32”

Das 44 amostras testadas com o protocolo *nested*-PCR “LipL32”, os resultados obtidos foram 34⁻/44 (77,3%) e 10⁺/44 (22,7%), com a seguinte distribuição: uma amostra de sangue de roedor, uma amostra de baço de roedor, sete amostras de água e uma amostra de solo (**Tabela 9**). Nas amostras humanas todas foram negativas em *nested*-PCR, como se pode verificar na **Figura 10**.

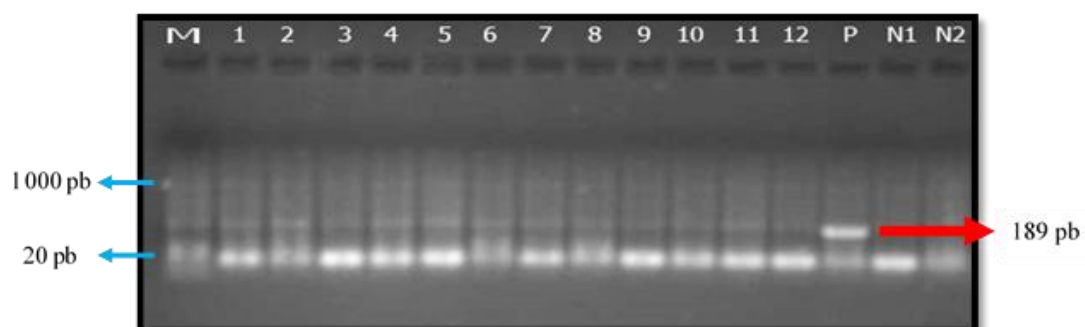


Figura 10. Representação da amplificação de DNA leptospírico das amostras humanas (soro e urina) pela técnica de *nested*-PCR. (M – Marcador molecular 1000 pb; 1 a 7 – amostras de soro; 8 a 12 – amostras de urina; P – controlo positivo; N1 e N2 – controlo negativo)

2.2. Detecção de DNA leptospírico por qPCR “LipL32”

As mesmas amostras foram testadas com o protocolo qPCR “LipL32”, e os resultados obtidos revelaram 25 amostras sem amplificação de DNA (56,8%) e 19 amostras positivas, isto é, onde houve a referida amplificação (43,2%), com a seguinte correspondência: duas amostras de baço, uma amostra de sangue de roedor, sete amostras de doentes (cinco de soro e duas de urina), oito amostras de água e uma amostra de solo (**Tabela 13**).

Tabela 13. Resultados percentuais obtidos nas amostras em estudo de acordo com a técnica realizada

Amostras	<i>Nested-PCR</i> Negativo	<i>Nested-PCR</i> Positivo	qPCR Negativo	qPCR Positivo
Sangue de Roedor	2	1	2	1
Baço de Roedor	2	1	1	2
Soro humano	7	0	2	5
Urina humana	5	0	3	2
Águas	10	7	9	8
Solos	8	1	8	1
Total	34	10	25	19
Total	44		44	
Percentagem (%)	(77,3)	(22,7)	(56,8)	(43,2)

Assim, das 77,3% das amostras negativas em *nested*-PCR, 41,2% foram positivas quando amplificadas pelo método qPCR, (**Figura 11**).

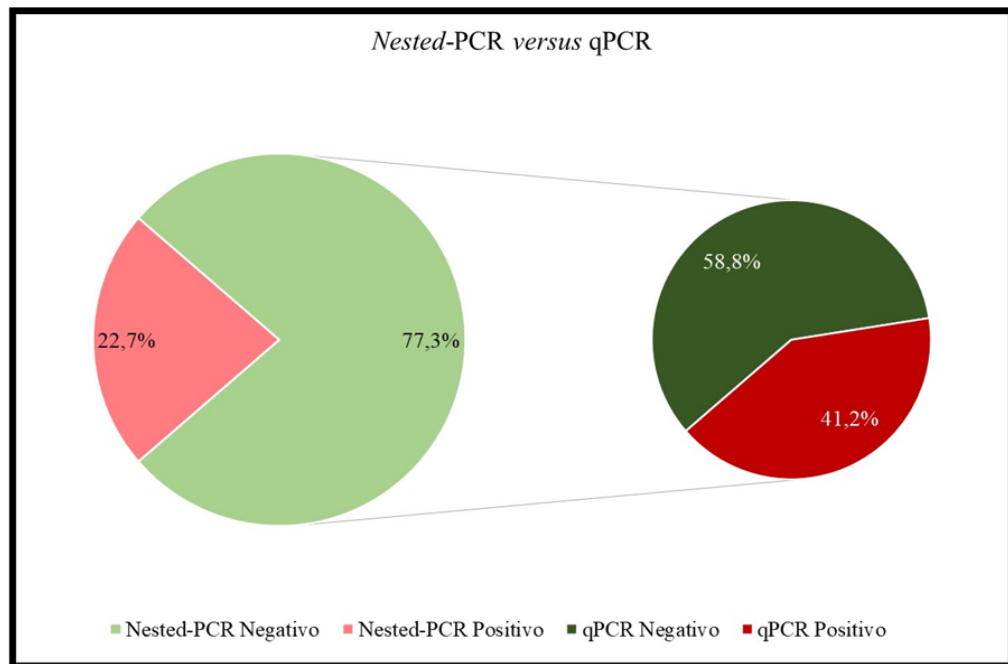


Figura 11. Representação gráfica dos resultados obtidos em percentagem pela *nested*-PCR e qPCR no total de amostras estudadas

Nas amostras clínicas cujos resultados foram negativos na *nested*-PCR, quando estudadas pelo protocolo qPCR “LipL32” os resultados mostraram que 41,7% foram negativas, enquanto 58,3% das mesmas foram positivas, ou seja, ocorreu amplificação do DNA leptospírico. Destas, 41,6% (n=5) eram amostras de soro e 16,7% (n=2) de urina, (**Figura 12**).

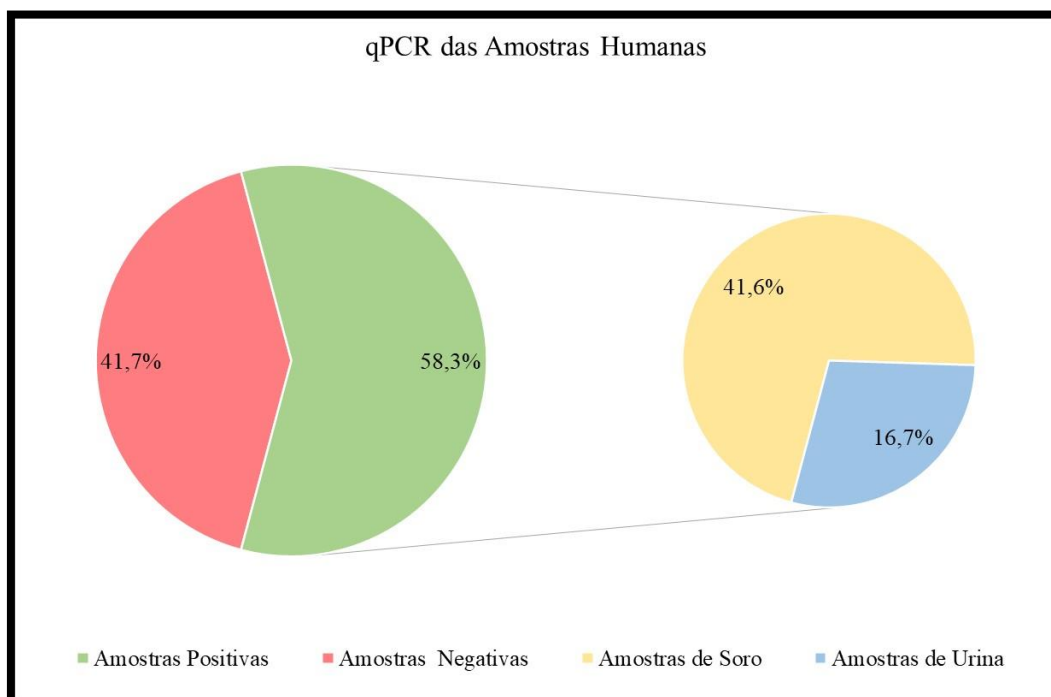


Figura 12. Representação gráfica dos resultados obtidos (em percentagem) pela qPCR nas amostras humanas (soro e urina)

Quando comparados os resultados obtidos verificou-se existir uma diferença estatisticamente significativa entre os dois protocolos ($p = 0,0339$).

3. Teste de Sensibilidade

3.1. Determinação do *Lower Limit of Detection* nas culturas puras de *Leptospira* spp

De acordo com o descrito em **Material e Métodos** (Ponto 5) determinou-se o LLOD em serovares representativos de duas espécies patogénicas de *Leptospira* (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*), cujos resultados estão apresentados na **Figura 13**. De referir que este procedimento foi realizado em triplicado, de forma a aferir-se da reprodutibilidade do método.

Perante a análise da **Figura 13**, obtida a partir dos dados conseguidos na primeira amplificação, pode verificou-se que o LLOD correspondeu à diluição mais alta, 10^0 , que equivale a 10^0 GE/ μ l, ou seja, é apenas necessário ter uma bactéria na amostra em estudo para que haja amplificação do DNA leptospírico, sendo este

resultado comum para os quatro serovares, o mesmo foi observado quando verificamos um valor de R^2 de 0,99, mostrando que os valores estão ajustados quase perfeitamente à reta linear.

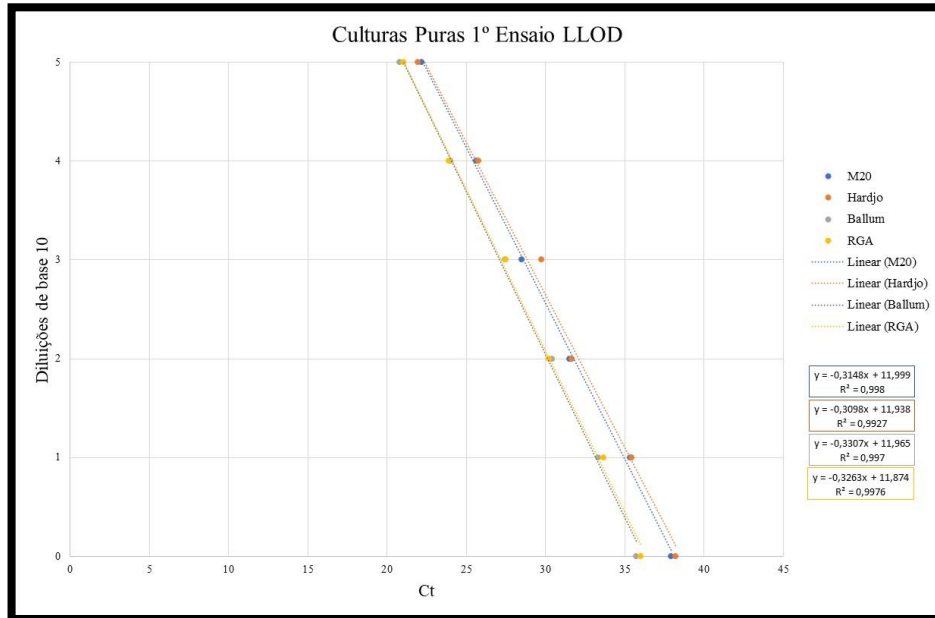


Figura 13. Representação gráfica da determinação do LLOD de culturas puras (serovares de duas espécies patogênicas de *Leptospira*) resultante da primeira amplificação, usando o protocolo de qPCR “LipL32”

Na segunda amplificação pela qPCR, obteve-se o mesmo LLOD (10^0 GE/ μ l) e R^2 (0,99), observados na primeira amplificação. Verificou-se também que quanto maior for a diluição melhor é a *performance* da amplificação do DNA leptospírico, obtendo-se um Ct superior a 35.

3.2. Sensibilidade da qPCR

No âmbito do estudo da sensibilidade do protocolo da qPCR, o estudo da mesma teve por base as culturas puras (serovares de referência de *Leptospira* spp) utilizadas anteriormente e também amostras já testadas em estudos anteriores e cujo resultado havia sido negativo. Desta forma através dos resultados obtidos foi possível observar como se comporta o protocolo da qPCR “LipL32” em amostras biológicas e ambientais negativas quando misturadas com culturas puras.

3.2.1. Sensibilidade do protocolo qPCR “LipL32” em amostras biológicas e ambientais

No gráfico (Figura 14) pode observar-se que o LLOD, nas amostras de sangue de roedor, é 10^0 GE/ μ l para os serovares Ballum, Hardjo e Icterohaemorrhagiae (RGA), enquanto que para o serovar Copenhageni (M20) se obteve um valor de LLOD de 10^1 GE/ μ l. Relativamente, a R^2 , os serovares Copenhageni (M20) e Icterohaemorrhagiae (RGA) foram os que mostraram valores de R^2 de 0,99, enquanto que os serovares Hardjo e Ballum se obtive valores de 0,87 e 0,95, respetivamente.

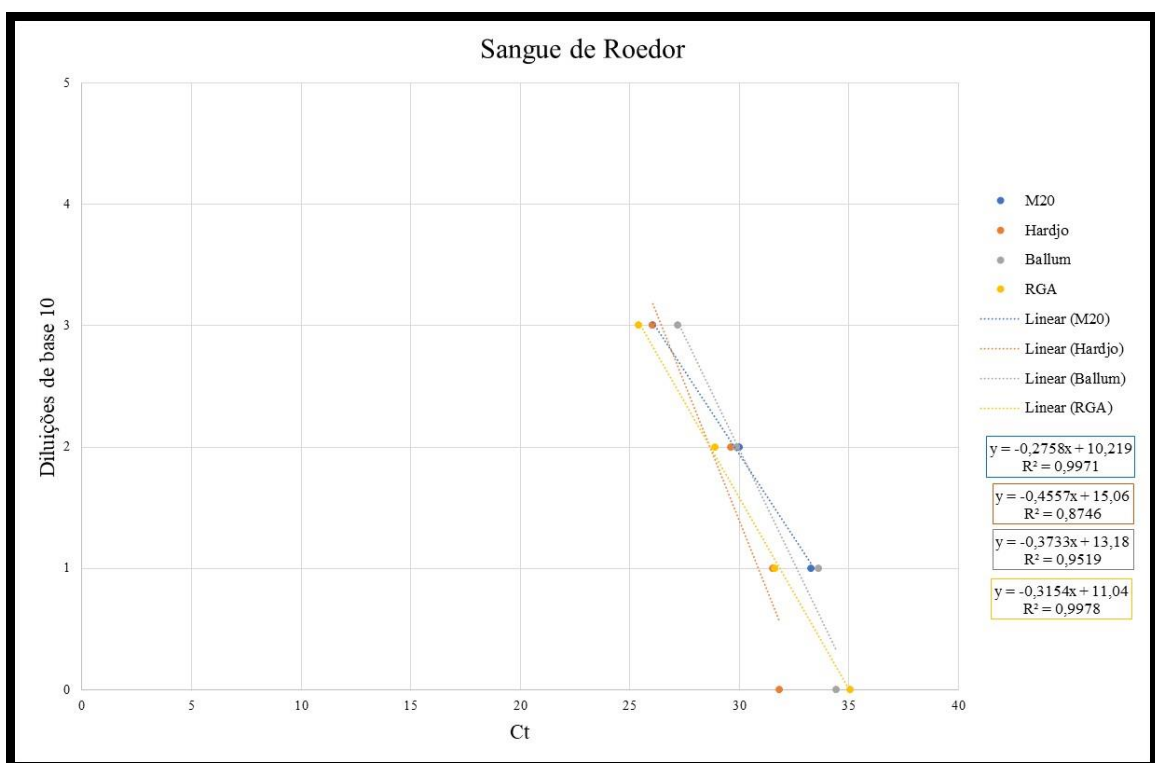


Figura 144. Representação gráfica da sensibilidade do protocolo de qPCR para os serovares em estudo de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

O gráfico (Figura 15), onde estão representados os resultados obtidos nas amostras de baço de roedores, mostra um valor de R^2 0,99 em todos os serovares, exceto em Icterohaemorrhagiae (RGA), cujo R^2 foi de 0,95. No serovar Copenhageni (M20) obteve-se uma maior sensibilidade, 10^0 GE/ μ l, e a menor no serovar Hardjo, com 10^2 GE/ μ l, sendo que o valor intermédio da sensibilidade foi conseguido nos serovares Ballum e Icterohaemorrhagiae (RGA), 10^1 GE/ μ l.

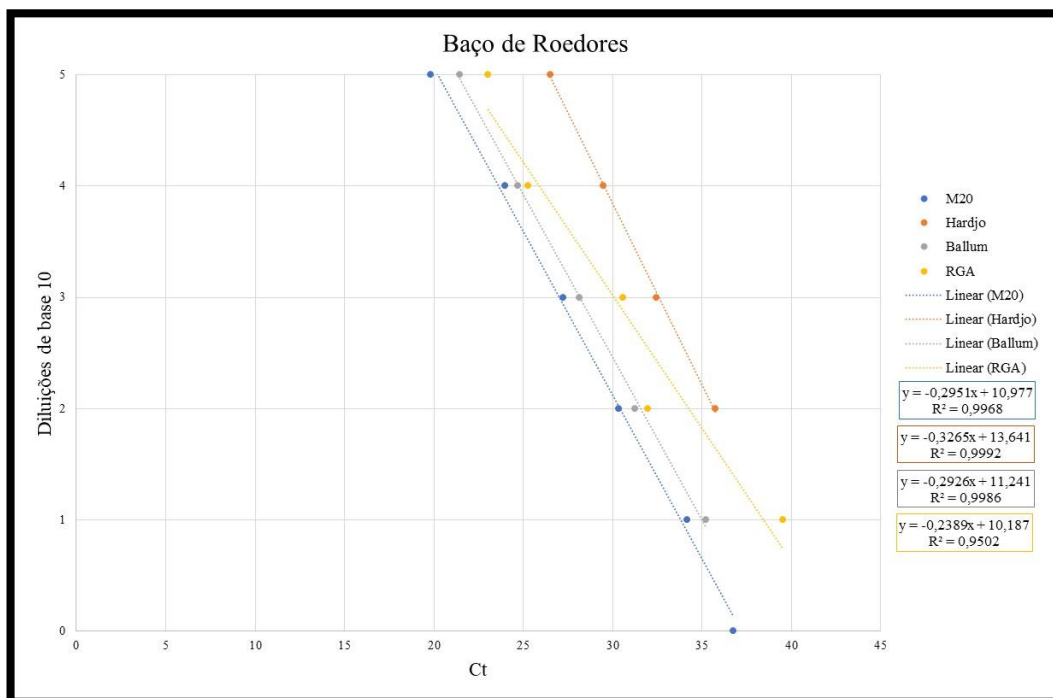


Figura 15. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de baço de roedores, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

No que respeita à sensibilidade da qPCR nas amostras de soro de doentes, representada no gráfico (**Figura 16**), verifica-se que o referido teste tem uma boa sensibilidade para os quatro serovares, 10^0 GE/ μ l. Resultado idêntico foi conseguido nas culturas puras (**Figura 13**), bem como nos respetivos valores de R^2 , verificando-se, no entanto, um valor deste último mais baixo no serovar *Icterohaemorrhagiae* (RGA) ($R^2=0,98$).

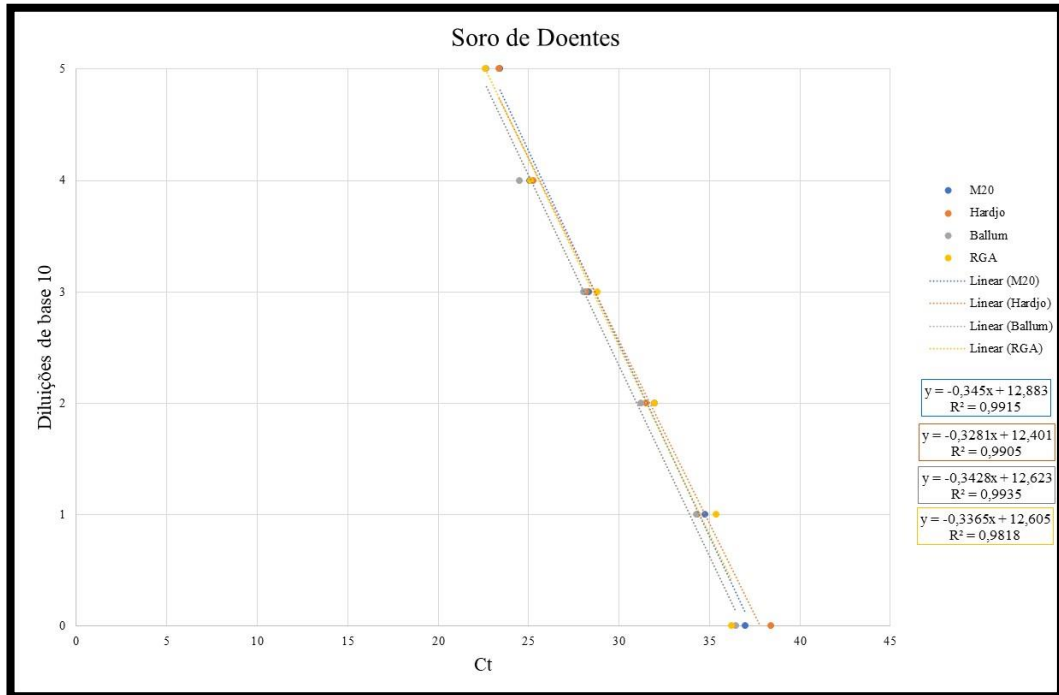


Figura 16. Representação gráfica da determinação sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras clínicas (soro), de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

Relativamente às amostras de urina (**Figura 17**), obteve-se maior sensibilidade no serovar Ballum (10^0 GE/ μ l), ainda que o R² do mesmo seja de 0,96. Por outro lado, com sensibilidades menores, 10^1 GE/ μ l, os restantes serovares obtiveram um valor de R² de 0,99, demonstrando que os valores de Ct estão ajustados à reta linear.

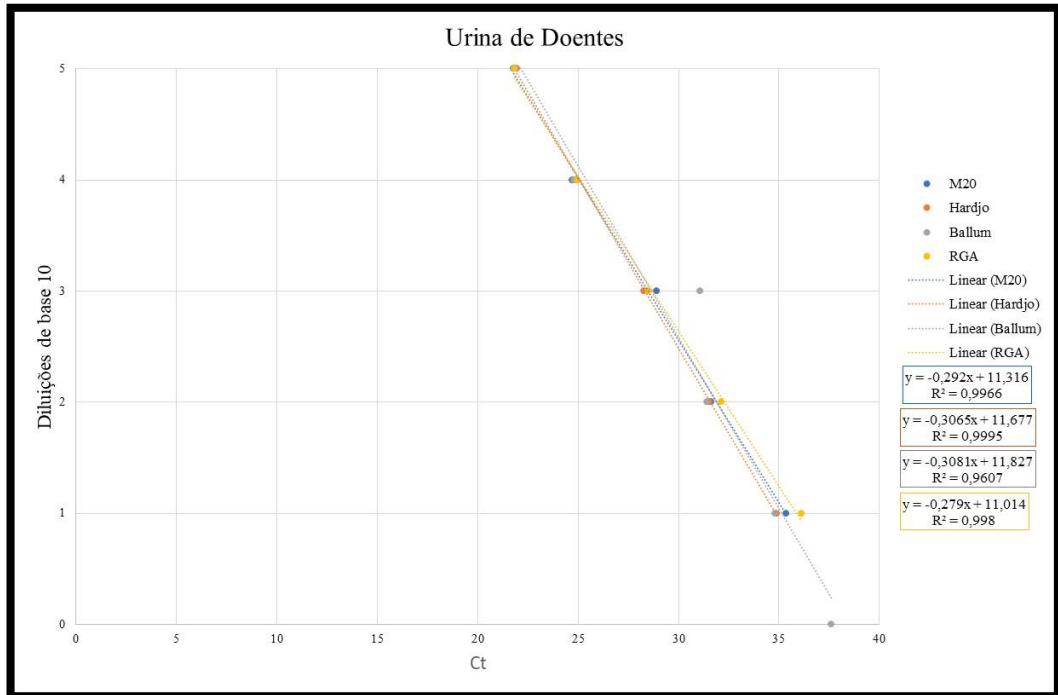


Figura 17. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras clínicas (urina), de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

Em relação às amostras ambientais (água e solo) os resultados obtidos estão representados nos gráficos das **Figuras 18 e 19**, respetivamente. Nas amostras de água obteve-se uma reta linear com valor de R^2 de 0,97 no serovar Copenhageni (M20), e de 0,99 nos restantes serovares. A sensibilidade da qPCR apontou para 10^0 GE/ μ l em todos os serovares.

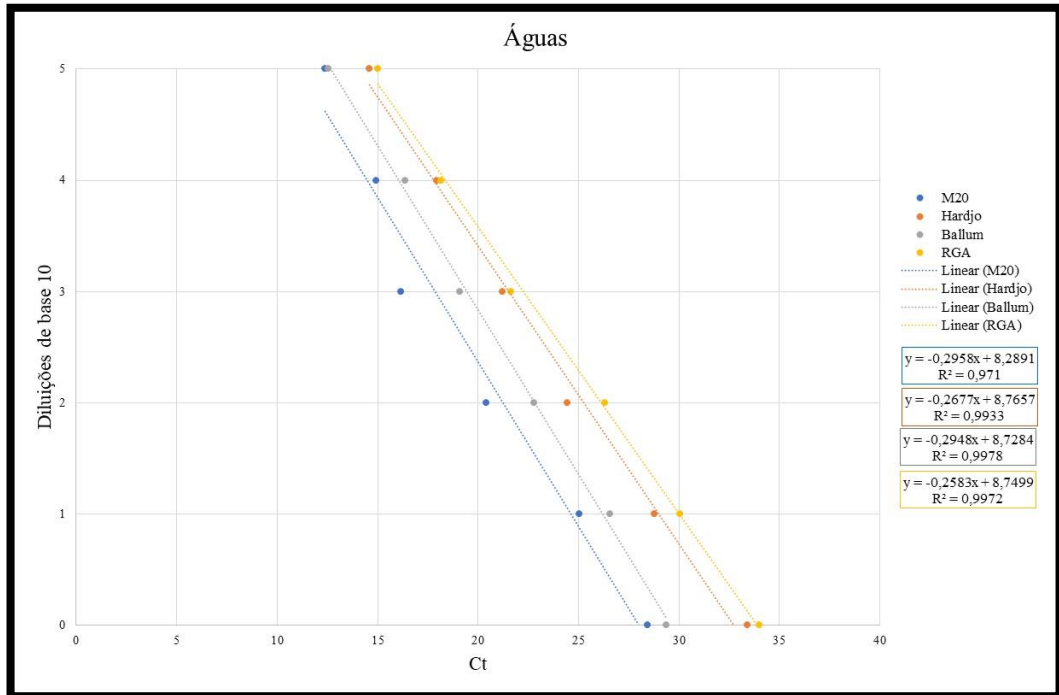


Figura 18. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de água, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

Nas amostras de solo obtiveram-se resultados idênticos (**Figura 19**) aos das amostras de água (**Figuras 18**), com a diferença que o valor R^2 foi de 0,98 no serovar Ballum, e de 0,99 nos restantes serovares. A sensibilidade obtida foi também análoga à observada nas amostras de água, 10^0 GE/ μ l, para todos os serovares.

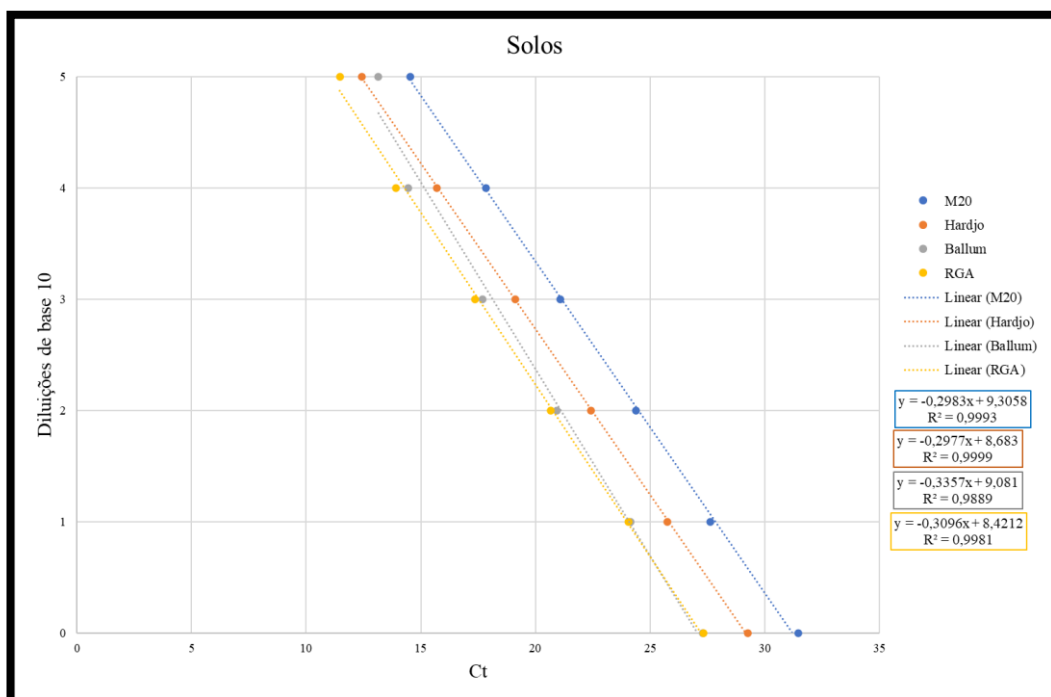


Figura 19. Representação gráfica da determinação da sensibilidade do protocolo de qPCR na amplificação de amostras de solo, de acordo com o valor de Ct obtido nas diluições.

3.2.2. Sensibilidade do protocolo da qPCR Actina nas amostras biológicas

Conforme referido anteriormente (**Material e Métodos**, Ponto 4.3) fez-se a mistura dos *pools* com culturas puras dos quatro serovares em volumes iguais. Assim, com recurso ao protocolo de qPCR com *primers* dirigidos ao gene da Actina, foi possível demonstrar que nos referidos *pools* havia DNA genómico humano e animal nas amostras estudadas.

De acordo com a tabela a baixo, **tabela 14**, verifica-se que ocorreu amplificação do gene Actina, nos *pools* que continham culturas puras dos quatro serovares e amostras biológicas humana e animais. Na **tabela 14** observa-se a sensibilidade que foi conseguida nos *pools*.

A amostra de baço de roedor foi a que conseguiu melhor sensibilidade nas 4 amostras, com os seus respetivos serovares, 10^0 GE/ μ l. De seguida a amostra de soro humano também obteve boa sensibilidade em duas amostras com os serovares Copenhageni (M20) e Hardjo (10^0 GE/ μ l), havendo uma menor sensibilidade nos restantes serovares (10^1 GE/ μ l). Menor sensibilidade foi conseguida nas amostras

sangue de roedor e urina humana, 10^3 GE/ μ l, estas amostras continham o serovar Icterohaemorrhagiae (RGA).

Tabela 14. Resultados de sensibilidade obtidos no protocolo Actina

	Copenhageni (M20)	Harjo	Ballum	Icterohaemorrhagiae (RGA)
Sangue de Roedor	10^2 GE/ μ l			10^3 GE/ μ l
Baço de Roedor	10^0 GE/ μ l			
Soro Humano	10^0 GE/ μ l		10^1 GE/ μ l	
Urina Humana	10^2 GE/ μ l			10^3 GE/ μ l

4. Teste de Especificidade

Para a realização do teste de especificidade foi usado um serovar de uma espécie saprófita de *Leptospira*, (serovar Patoc) de *L. biflexa* e de outras espiroquetas, nomeadamente, *Borrelia burgdorferi* e *Treponema pallidum*, e ainda um protozoário do género *Leishmania*.

Os resultados obtidos na reação de amplificação de DNA, usando o protocolo “LipL32” são apresentados na (**Tabela 15**), não tendo sido obtida qualquer amplificação de DNA leptospírico.

Tabela 15. Resultados do teste de especificidade, usando um protocolo com *primers* “LipL32”, para amplificação de DNA leptospírico

Microorganismos	Ct
<i>L. biflexa</i> (Patoc)	Negativo
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Negativo
<i>Treponema pallidum</i>	Negativo
<i>Leishmania</i>	Negativo

5. Teste de Viabilidade de *Leptospira* spp

Neste âmbito, foram testadas quatro amostras ambientais (**Figura 20**), cujos resultados foram positivos na *nested*-PCR e na qPCR, conforme referido em **Materiais e Métodos** (Ponto 8), para a determinação da viabilidade de bactérias potencialmente prejudiciais em termos de saúde, em contexto ambiental. Assim, foi feito um pré-tratamento das amostras com PMA, seguindo-se a extração de DNA genómico e por último a amplificação do mesmo, conforme descrito anteriormente em 3.2 e 4.2 (**Materiais e Métodos**), respetivamente.

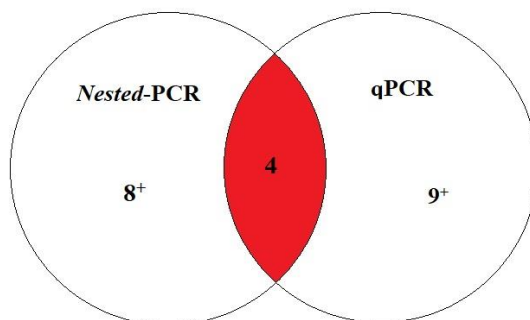


Figura 200. Representação gráfica das amostras selecionadas (a vermelho) para o teste de viabilidade

Observam-se (**Tabela 16**) valores de Ct superiores na reação de qPCR das amostras tratadas com PMA, em relação aos Ct obtidos na reação de qPCR das amostras sem o referido tratamento. Quando calculada a percentagem de bactérias viáveis, foi obtida uma maior percentagem (70,4%), na amostra de água 103, cuja diferença entre os valores de Ct obtidos nas amostras tratadas e não tratadas ($\Delta Ct_{amostra}$) foi de 0,51. Por outro lado, na amostra de água 68, observou-se, nas mesmas circunstâncias, uma $\Delta Ct_{amostra}$ de 4,96, a que correspondeu uma percentagem de bactérias viáveis de 3,2%.

Tabela 16. Resultados do Teste de Viabilidade em amostras de água sujeitas a tratamento com PMA

Amostras de Águas	Ct qPCR	Ct qPCR c\ PMA	$\Delta Ct_{amostra} = Ct_{(amostra, tratada\ com\ PMA)} - Ct_{(amostra, não\ tratada)}$	% viável = $100 / (2^{(amostra\ \Delta Ct_{amostra})})$
61	33,92	36,63	2,71	15,3
68	32,09	37,05	4,96	3,2
103	35,88	36,39	0,51	70,4
106	34,93	37,92	2,99	12,6

Em resumo, uma vez que foi obtida amplificação, após o tratamento com PMA, verificou-se que nas amostras ambientais existia a presença de bactérias viáveis prejudiciais para os humanos e outras espécies animais.

IV. Discussão e Conclusões

Com este estudo pretendeu-se otimizar um protocolo de qPCR, usando os *primers* “LipL32”, e a sonda *TaqMan*, esperando conseguir melhorar por esta abordagem, os resultados já obtidos em amostras previamente estudadas e que haviam revelado a presença de DNA leptospírico, como também em algumas outras, cuja amplificação não foi inicialmente obtida, por falta de sensibilidade na abordagem molecular realizada, em particular, através do protocolo de *nested-PCR*, cuja limitação foi agora superada pelo protocolo de qPCR.

Na quantificação de DNA resultante da extração verificou-se uma ligeira diferença da concentração do mesmo, entre as amostras de soro e de urina, o que se admite dever-se ao facto de no sangue humano de onde resultou o soro existirem vários tipos de células, enquanto a urina é composta sobretudo pelos nutrientes que são ingeridos pelo indivíduo, pelo que o DNA que foi extraído provém das células mortas no organismo dos indivíduos, tais como células da uretra. No que respeita à concentração de DNA nas amostras de sangue e baço de roedores, obtiveram-se melhores resultados no baço dos referidos animais, por se tratar de um órgão sólido.

Por outro lado, nas amostras ambientais foi detetada uma menor quantidade de DNA, o que pode ser devido a algumas limitações tais como: *i*) colheita realizada em zonas próximas de casos de leptospirose, *ii*) erros de pipetagem e *iii*) degradação de DNA genómico, entre outras.

Foi utilizado o protocolo *nested-PCR* “LipL32” nas amostras biológicas humanas, visto que nestas amostras haviam sido executados outros testes para o seu diagnóstico, entre os quais o teste de referência (MAT). Assim, a amplificação de DNA leptospírico usando o protocolo *nested-PCR* e o protocolo qPCR, nas referidas amostras, permitiu observar a ausência de amplificação de DNA com o primeiro dos referidos protocolos (*nested-PCR*). Em contrapartida, obtiveram-se resultados positivos superiores a 50% nas mesmas amostras pelo protocolo qPCR.

Importa referir que em quase 80% de amostras com resultado previamente negativo para leptospirose pela *nested*-PCR, foi detetado DNA de *Leptospira* spp em cerca de 41% quando se reavaliaram por qPCR. Ficou assim evidente que os resultados obtidos pelas duas abordagens se traduzem pela vantagem na utilização da qPCR em detrimento da *nested*-PCR. Estes resultados são assim extremamente abonatórios e promissores para uma mudança de paradigma na futura abordagem de diagnóstico laboratorial da referida doença, tal como acontece com diversas outras, nomeadamente a atual abordagem de diagnóstico da COVID-19 [49, 50, 51].

No entanto, no que respeita às amostras ambientais, é importante referir que em quatro amostras [água (3) e solo (1)] onde se registou previamente amplificação de DNA leptospírico pela *nested*-PCR, tal não aconteceu pelo protocolo da qPCR. Este resultado, inicialmente não expectável, pode ser explicado pela degradação do DNA devido ao descongelamento e congelamento das amostras, outro possível motivo é a potencial contaminação na execução do protocolo *nested*-PCR, uma vez que este, é um método com uma grande probabilidade de ocorrência de contaminação, por incluir duas amplificações, como foi referido anteriormente (**Introdução**, Ponto 6.1). Em suma, a reação de qPCR pode vir igualmente a constituir um método a considerar na deteção de DNA de *Leptospira* spp em amostras ambientais, como também demonstrado por Schneider (2018) num estudo realizado em áreas urbanas no Brasil [3].

Um outro aspeto relevante neste trabalho prende-se com a determinação de LLOD, tendo sido para o efeito realizadas duas amplificações em culturas puras de leptospiras, com resultados semelhantes em ambas. Porém, importa relevar que na segunda amplificação, não ocorreu amplificação na diluição de 10^0 no serovar Copenhagení (M20), sendo que uma possível razão para este facto poderá ter sido uma vez mais algum erro de pipetagem para a placa de amplificação. No entanto, a ausência desta amplificação não influenciou o valor de R^2 de 0,99. Concluímos assim, que o LLOD em culturas puras é de 10^0 GE/ μ l com um Ct superior a 35. Estes resultados demonstram que o protocolo qPCR “LipL32” é capaz de detetar pequenas quantidades de DNA leptospírico, resultado este que está de acordo com os achados obtidos em estudos realizados por Bourhy e colaboradores [48] e por Kim e colaboradores [33].

Quanto à sensibilidade da qPCR nas amostras de sangue de roedores, foram obtidos resultados diferentes dos conseguidos nas culturas puras. A sensibilidade obtida foi de 10^1 GE/ μ l para o serovar Copenhageni (M20) e de 10^0 GE/ μ l para os restantes serovares. Admite-se que esta diferença possa dever-se a algumas causas, entre as quais, *i*) má homogeneização no vórtex após a mistura dos *pools* com as culturas puras e entre diluições; *ii*) escassez de DNA leptospírico; e *iii*) presença de hemoglobina, como já referenciado na literatura, em diversos estudos, que apontam para o facto de da hemoglobina poder ter um efeito inibitório na amplificação de DNA, como descrito por Sidstedt ^[53] entre outros. Relativamente aos resultados da sensibilidade, da qPCR, os melhores foram obtidos na amplificação de DNA nas amostras de sangue de roedores, embora com uma variação entre 10^0 e 10^1 GE/ μ l. Comparativamente às amostras de baço dos roedores, foi nas de sangue dos mesmos, que se observou uma maior sensibilidade, para os serovares Ballum, Hardjo e Icterohaemorrhagiae (RGA), o que se justifica pela natureza da constituição dos respetivos tecidos.

Em relação aos resultados obtidos nas amostras biológicas humanas (soro e urina de pacientes) conclui-se que estes resultados são idênticos aos que foram obtidos nas culturas puras, sendo a sensibilidade da qPCR de 10^0 GE/ μ l para o soro de doentes, e para a urina dos mesmos, 10^0 GE/ μ l no serovar Ballum, e 10^1 GE/ μ l nos restantes serovares. Estes resultados são assim, mais uma demonstração que o protocolo qPCR “LipL32” é um método que deve ser considerado no contexto da leptospirose, antecipando o seu diagnóstico com a mais-valia de permitir iniciar o respetivo tratamento o mais cedo possível, de forma a evitar-se que os doentes desenvolvam sintomas mais graves, podendo até evoluir para situações críticas, incluindo o óbito.

Relativamente aos resultados nas amostras ambientais, estes foram também idênticos aos das culturas puras, 10^1 GE/ μ l, no entanto, com valores de Ct inferiores, compreendidos entre 25 e 35, enquanto as culturas puras mostraram um valor de Ct superior a 35.

Ainda uma referência ao protocolo qPCR Actina cuja inclusão no presente trabalho foi considerada relevante, dado ter como objetivo demonstrar a existência de DNA genómico humano e animal. Relativamente à sensibilidade no protocolo da qPCR Actina, foram obtidos melhores resultados no protocolo “LipL32”, com as amostras de

sangue de roedor, 10^0 GE/ μ l. Por outro lado, em amostras de baço, a sensibilidade foi superior, 10^0 GE/ μ l, em todos os serovares. Quanto às amostras de soro humano, a sensibilidade da qPCR variou entre 10^0 GE/ μ l e 10^1 GE/ μ l e resultados idênticos foram conseguidos no protocolo “LipL32”. Por fim, nas amostras de urina humana a sensibilidade foi de 10^2 GE/ μ l, isto é, uma sensibilidade menor, quando comparado com a sensibilidade obtida no protocolo “LipL32” que teve sensibilidade de 10^0 GE/ μ l no serovar Ballum e 10^1 GE/ μ l nos restantes serovares. Uma causa possível para esta diferença pode ter sido uma possível degradação de DNA previamente extraído, devido à congelação e descongelação das amostras, dado que estas amostras já tinham sido anteriormente usadas.

No que respeita ao teste de especificidade realizado, conforme esperado, não ocorreu amplificação de DNA leptospírico no serovar Patoc (*L. biflexa*) bem como nos restantes microrganismos incluídos no teste, uma vez que os *primers* usados têm como alvo o gene *lipL32* que está presente em todas as espécies patogénicas de *Leptospira*. Considerando esta especificidade, o DNA extraído do serovar Patoc, enquanto representante de leptospiros saprófitas, não seria amplificado como se verificou, o que também foi observado por outros investigadores em estudo anterior (Bourhy e colaboradores, 2011)^[48].

Quanto ao teste de viabilidade que teve como objetivo verificar se as bactérias (leptospiros), presentes nas amostras ambientais, estavam viáveis e se tinham capacidade infetante para os humanos, verificou-se que os valores obtidos de Ct foram diferentes em ambos os ensaios de qPCR (com e sem PMA), sendo inversamente proporcionais. Resultados semelhantes foram igualmente obtidos noutros estudos como os reportados por Brianna Tarnower (Dissertação de Mestrado) e também num estudo realizado por Nocker, respetivamente^[41, 52]. Da análise da diferença dos valores de Ct das amostras tratadas e não tratadas com PMA, para quantificar as células viáveis, foi possível concluir que quanto menor for o valor de $\Delta Ct_{amostra}$ maior a percentagem de células viáveis. A razão pela qual foi realizado a qPCR com PMA em quatro amostras de água, foi exatamente porque estas amostras também foram positivas na *nested*-PCR para a presença de DNA leptospírico, sendo esta uma das abordagens moleculares usada para o diagnóstico de leptospirose. O teste de viabilidade mostrou assim, constituir uma mais valia, tendo sido utilizado no laboratório pela 1ª vez, no âmbito deste trabalho,

para a detecção de leptospiros viáveis no ambiente, por serem estas, as responsáveis pela infecção humana e animal sendo por isso, esta abordagem mais uma importante ferramenta no contexto da saúde pública, ou mesmo em termos mais abrangentes, de *One Health*.

Deste modo, espera-se que este estudo sirva de base para futuros desenvolvimentos na investigação de diferentes espécies de *Leptospira*, usando o PMA de forma a fornecer uma visão mais ampla sobre os mecanismos da patogenicidade destes espiroquetídeos *versus* importância clínica e respetiva transmissão ambiental dos mesmos. Assim, o protocolo qPCR “LipL32” com tratamento de PMA pode ser uma ferramenta suficientemente sensível para a detecção de leptospiros patogénicas viáveis no ambiente e até em amostras humanas, quando a doença ainda está na fase inicial.

Face ao exposto, é da maior importância avaliar os diversos biótopos, quer solos quer coleções de água doce para se perceber em que local (ou locais) é mais provável encontrar leptospiros, e assim fornecer informação às Autoridades de Saúde e responsáveis autárquicos para a necessidade de alertarem a população para o potencial risco de infecção em espaços públicos como jardins ou espaços aquáticos (ex. lagos, lagoas, rios, barragens, etc), conhecidos que são, os riscos agora demonstrados no presente trabalho, no que à leptospirose diz respeito.

V. Referências Bibliográficas

1. Adler B, Moctezuma A. (2008) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140 (2010) 287-296. [http:// doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012](http://doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012).
2. Masuzawa T, Uno R, Matsubishi N, Yamaguchi M, et. al. (2019) Comparison of *Leptospira* species isolated from environmental water and soil in Japan. *Microbiol and Immunol.* 63(11): 1-5. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12741>.
3. Schneider AG, Casanovas-Massama A, Hacker KP, Wunder EA Jr. et. al. (2018) Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl Trop Dis* 12(4): 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415>.
4. Bharti AR, Nally JE, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3(12): 757-771. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2).
5. Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2): 296-326. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296–326.2001.
6. Casanovas-Massana A, Costa F., Riediger IR, Cunha M. et. al. (2017) Spatial and temporal Dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. *Water Res* 130: 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.068>.
7. Boey K, Shioma K, Rajeev S. (2019) *Leptospira* infection in rats A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop. Dis* 13(8): 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>.
8. Stoddard RA (2013) Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. Through Real-Time PCR (qPCR) Targeting the *lipI32* Gene. *PCR Detetion of Microbial Pathogens: Second Edition, Methods in Molecular Biology, Vol. 943: 257-266.* https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_17.

9. Galloway RL, Hoffmaster AR (2015) Optimization of *lipL32* PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 82(3):199-200. [https://doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.024](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.024).
10. Monash University (2015) – Medicine, Nursing and Health Sciences. *Leptospira Diagnostic Serology* [Web page]; disponível em: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/leptospirosis/> [acedido a 16 Dez 2019].
11. Karuniawati A, Yasmon A, Ningsih I (2012) Optimizing real-time PCR method to detect *Leptospira* spp. in human blood and urine specimens. *Med J Indones*, 21(1): 13-17. <https://doi.org/10.13181/mji.v21i1.472>.
12. Machry L, Ribeiro RL, Vital-Brazil JM, Balassiano IT et al. (2010) Characterization of *Leptospira* spp. reference strains using the pulsed field gel electrophoresis technique. *Rev Soc Bra de Med Trop* 43 (2): 166-169.
13. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons I.S. (1992) Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. In Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.*, 30(9): 2219-2224. DOI: 10.1128/JCM.30.9.2219-2224.1992.
14. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H., et al. (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.*, 43, 110-114. <https://doi.org/10.1099/00222615-43-2-110>.
15. Levett P, Morey R, Galloway R, Turner D, Steigerwalt A, et al. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.*, 54, 45-49. DOI 10.1099/jmm.0.45860-0.
16. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, et al. (2001) Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Human. *Infect. Imm.*, 69(8): 4958-4968. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4958–4968.2001.
17. Vanasco NB, Sequeira G, Fontana M, Fusco S, et al. (2000) Description of a leptospirosis outbreak in the city of Santa Fe, Argentina, March-April 1998. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 7(1).
18. Ismail S, Wahab N, Badya N, Rahman N, et al. (2014) A Study on the Presence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Environmental Water Samples Obtained from Selected

Recreational Areas in Terengganu, Malasya. Research J. Pharm. And Tech.7(10): 1153-1157.

19. Fonseca C, Freitas V, Romero E, Spinose C, et al. (2006) Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospiroses. Trop Med Int Health. 2: 1699-1707. DOI:10.1111/j.1365-3156.2006.01727.x.

20. Silva M, Camargo E, Vaz A, Souza A, et al. (1990) Imunodiagnóstico da leptospirose humana através do teste ELISA-Ig-M, empregando-se diferentes preparações antigénicas a partir de sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 32 (4): 233-239. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172212.14112016>.

21. Cumberland P, Everard C, Levett P. (1999) Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and Microscopic Agglutination Test (MAT) in the Diagnosis of Acute Leptospirosis. ASTMH, 61(5): 731-734. DOI:10.4269/ajtmh.1999.61.731.

22. Winslow W, Merry D, Pirc M and Devine P. (1997) Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin M Antibody in Diagnosis of Human Leptospiral Infection. American Society for Microbiology, 35(8): 1938-1942. DOI:10.1128/JCM.35.8.1938-1942.1997.

23. Adler B, Murphy A, Locarnini S and fauci S. (1980) Detection of Specific Anti-Leptospiral Immunoglobulins M and G in Human Serum by Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microbiol, 11(5): 452-457. DOI: 10.1128/JCM.11.5.452-457.1980.

24. Rosa M, Reis M, Simon C, Dondossola E et al. (2017) IgM ELISA for leptospiroses diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Ciências & Saúde Coletiva, p. 4001-4012. DOI: 10.1590/1413-812320172212.14112016.

25. Bal. A, Gravekamp C, Hartskeel R, De Meza-Brewster J, Korver H et al. (1994) Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol, 32(8): 1894-1898. DOI:10.1128/JCM.32.8.1894-1898.1994.

26. Kadri K. (2019) Chapter Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications, 1-17. *in Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*, IntechOpen, 206pp.
27. Courdurie C, Le Govic Y, Bourchy P, Alexer D, Pailla K, et al. (2017) Evaluation of diferente serological assays for early diagnosis of leptospiroses in Martinique (French West Indies). *PLoS Negl Trop Dis.* 11(6): 1-14 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005678>.
28. Sharmilah Kumari Kumaran, Mohd. Faizal Abu Bakar, Hirzahida Mohd-Padil, Shuhaila Mat-Sharani S. Sakinah, et al. (2017) 3D modelling if the pathogenic *Leptospira* protein LipL32: A bioinformatics approach. *Acta Tropica* 176: 433-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.011>.
29. Pejvak Khaki. (2016) Clinical Laboratory Diagnosis of Human Leptospirosis. *Int J Enteric Pathog.* 4(1): 1-7 DOI: 10.17795/ijep31859.
30. Turkan Togonal, Ali Senerm, Neslihan Yucel, Semra Demirbilek, Feride Sinem Akgun, et al. (2010) Intensive Care of a Weil's Disease With Multiorgan Failure. *J Clin Med Res*, 2(3): 45-159. DOI:10.4021/jocmr2010.05.302w.
31. Abhiram Chakrabarti, Manab nandy, Dipankar Pal, Sudesna Mallik. (2014) A rare case of Weil's disease with alveolar haemorrhage. *Asian Pae J Trop Biomad*, 4(1): 566-569. DOI:10.12980/APJTB.4.2014D126.
32. Mark A. Valesek and Joyce J. Repa. (2005) The Power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151-159. DOI:10.1152/advan.00019.2005.
33. Kim H.S., Kim D., Neupane G. P., Lee Y., Yang N., et al. (2008) Comparison of Conventional, Nested, and Real-Time PCR Assays for Rapid and Accurate Detection of *Vibrio vulnificus*. *J Clin Microbiol*, 46 (9): 2992- 2998. DOI: 10.1128/JCM.00027-08.
34. Novais, C. M.; Pires,A. M. (2004) PCR em Tempo Real. *Rev Biotecnol Ciência Desenvolvimento*, 33: 10-13.
35. Wang Z., Jin L. and Wegrzyn A. (2007) Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*, 6(39): 1-10. DOI:10.1186/1475-2859-6-39.

36. Cullen P., Haake Bylach D., Zuerner R. and Adler B. (2003) LipL21 is a novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. *Infect Imm*, 71(5): 2414-2421. DOI: 10.1128/IAI.71.5.2414–2421.2003.
37. Cullen P., Cordwell S., Bylach D., Haake D. and Adler B. (2002) Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. *Infect Imm*, 70(5): 2311-2318. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2311–2318.2002.
38. Hoke D., Egan S., Cullen P. and Adler B. (2008) LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. And *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Imm*, 76(5): 2063-2069. DOI:10.1128/IAI.01643-07.
39. Casanovas-Massana A., Pedra G., Wunder E., Diggle P., Begon M. et al. (2018) Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. *Appl Environm Microbiol*, 84: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>.
40. Bierque E., Thibeaux R., Girault D., Soupé-Gilbert M. and Goarant C. (2020) A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *Leptospirosis and environmnet*. PLoS ONE 15(1) 1-22. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>.
41. Tarnower B. (2012) Assessing the Response of *Leptospira licerasiae* serovar Varillal to Fresh and Brackish Waters Using Propidium Monoazide and qPCR (PMA-qPCR). Thesis Master of Science, University of California, Los Angeles. 41 pp. <https://escholarship.org/uc/item/25s8w876>.
42. Hauk P., Macedo F., Romero E., Vasconcellos S., Morais Z., Barbosa A. and Ho P. (2008) In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. *Infect Imm*, 76(6): 2642-2650. DOI: 10.1128/IAI.01639-07.
43. Haake D., Chao G., Zuerner R., Barnett J., Barnett D. et. Al. (2000) The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infect Imm*, 68(4): 2276-2285. DOI: 10.1128/iai.68.4.2276-2285.2000.

44. Lottersberger J., Guerrero S., Tonarelli G., Frank R., Tarabla H. and Vanasco N. (2009) Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol*, 49: 641- 645. DOI:10.1111/j.1472-765X.2009.02723.x.
45. Wang Z., Jin L. and Węgrzyn A. (2007) Leptospirosis Vaccines. *Microbial Cell Fact*: 6(34): 1-10. DOI:10.1186/1475-2859-6-39.
46. Harasawa R. (1996) Chapter PCR: Application of nested PCR to detection of Mycoplasmas, 75-79 in *Molecular and Diagnostic Procedure in Mycoplasmaology*, Vol. II, Academic Press, 2nd Edition, 466pp.
47. Puche R., Ferrés I., Caraballo L., Rangel Y., Picardeau M., et al. (2018) *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68(2): 513-517. DOI: 10.1099/ijsem.0.002528.
48. Bourhy P., Bremont S., Zinini F., Giry C. and Picardeau M. (2011) Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *J Clin Microbiol*, 49(6): 2154-2160. DOI:10.1128/JCM.02452-10.
49. Mohamadian M., Chiti H., Shoghli A., Biglari S., Parsamanesh N, et al. (2020) COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J. Gene Med*, 23(2): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>.
50. Zhou Y., Pei F., Ji M., Wang L., Zhao H., et al. (2020) Sensitivity evaluation of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) RT-PCR detection kits and strategy to reduce false negative. *PLoS ONE* 15(11): 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241469>.
51. Vanuytsel K., Mithal A., Giadon R., Yeung A., Matte T., et al. (2020) Rapid Implementation of a SARS-CoV-2 Diagnostic Quantitative Real-Time PCR Test with Emergency Use Authorization at a Large Academic Safety Net Hospital. *Med* 1(1): 152-157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.05.001>.
52. Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper A.K.. (2006) Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. Dead bacteria by

selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol. Methods* (67): 310-320.
DOI: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.

53. Sidstedt M., Radstrom P., Hedman J. (2020) PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS – mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*, (412): 2009-2023
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>.

VI. Anexos

1. Anexo 1

Tabela 17. Representação dos resultados globais de todas as amostras em estudo de acordo com a técnica realizada

Amostras	Métodos		
		<i>Nested-PCR</i>	qPCR
Sangue de Roedor	9	Negativo	Negativo
	49	Negativo	Negativo
	161	Positivo	Positivo
Baço de Roedor	51	Negativo	Negativo
	75	Negativo	Positivo
	107	Positivo	Positivo
Soro Humano	2.20	Negativo	Positivo
	5.20	Negativo	Positivo
	6.20	Negativo	Negativo
	11.20	Negativo	Positivo
	13.20	Negativo	Positivo
	19.20	Negativo	Negativo
	22.20	Negativo	Positivo
Urina Humana	12.20	Negativo	Negativo
	16.20	Negativo	Positivo
	20.20	Negativo	Positivo
	21.20	Negativo	Negativo
	25.20	Negativo	Negativo
Águas	42	Negativo	Positivo
	43	Negativo	Positivo
	44	Negativo	Positivo
	61	Positivo	Positivo
	68	Positivo	Positivo
	83	Negativo	Negativo
	84	Negativo	Positivo
	103	Positivo	Positivo
	104	Negativo	Positivo
	106	Positivo	Positivo
	114	Negativo	Negativo
	119	Negativo	Negativo
	122	Positivo	Negativo
	136	Positivo	Negativo
	137	Positivo	Negativo
140	Negativo	Negativo	
142	Negativo	Negativo	

Amostras	Métodos		
	<i>Nested-PCR</i>	qPCR	
Solos	1	Negativo	Negativo
	7	Negativo	Negativo
	10	Negativo	Negativo
	45	Negativo	Positivo
	56	Negativo	Negativo
	62	Negativo	Negativo
	78	Positivo	Negativo
	82	Negativo	Negativo
	89	Negativo	Negativo