



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA LAMP
(*LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL DNA AMPLIFICATION*) PARA
A IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS GENOESPÉCIES DO
COMPLEXO *Borrelia burgdorferi sensu lato***

MARTA MARIA ALMEIDA DIAS DO NASCIMENTO

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO 2016



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA LAMP
(*LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL DNA AMPLIFICATION*) PARA
A IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS GENOESPÉCIES DO
COMPLEXO *Borrelia burgdorferi sensu lato***

MARTA MARIA ALMEIDA DIAS DO NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

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

Trabalho desenvolvido no Laboratório do GBL, UEI de Microbiologia Médica, IHMT, UNL.

JABEIRO 2016

Apresentações em reuniões científicas

O trabalho desenvolvido durante a elaboração desta dissertação de Mestrado foi parcialmente apresentado, sob a forma de comunicação oral em 2014 e 2015, nas seguintes reuniões científicas:

Mónica Nunes*, Maria Luísa Vieira, João Inácio, **Marta Nascimento**, Ricardo Parreira. “**Otimização da técnica LAMP para a identificação de genoespécies de *Borrelia burgdorferi* s.l.**”. 5^{as} Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em 12 de Dezembro 2014.

Disponível em: http://www.ihmt.unl.pt/images/uploaded/news/Resumo_MonicaNunes.pdf

[*CO pela 1^a autora]

Marta Nascimento, Mónica Nunes, Ricardo Parreira, Maria Luísa Vieira (2015). “**Otimização de uma técnica de amplificação isotérmica associada a sondas moleculares para identificação das espécies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato mais prevalentes em Portugal**”. Comunicação oral no dia 21 de abril inserida na mesa redonda "Novas tecnologias e prevenção de doenças transmitidas por vetores". 3^o Congresso Nacional de Medicina Tropical - 1^o Congresso Lusófono de doenças Transmitidas por Vetores, 20 e 21 de abril 2015. Disponível em: Pag. 23 in <http://congressomedtrop2015.admeus.net/?page=1>

Marta Nascimento, Mónica Nunes, M. Luísa Vieira (2015). “**Optimization of a isothermal amplification technique (LAMP) for the identification of the major species of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Portugal**”. Poster apresentado no Congresso de Microbiologia e Biotecnologia – Microbiotec’ 15, realizado na Universidade de Évora de 10 a 12 de dezembro’15.

Agradecimentos

Ao aceitar este desafio académico, que envolve uma grande parte da nossa vida, surgem alterações a vários níveis, que sem a presença das pessoas que nos rodeiam ao longo deste percurso, não seria possível concretizar, agradeço do coração:

À orientadora desta dissertação de mestrado a Inv.^a Doutora Maria Luisa Vieira, que tão bem me recebeu na sua equipa, acompanhando e orientando o trabalho que ia sendo elaborado a par do seu apoio e incentivo que demonstraram ser tão importantes.

À querida tutora Mestre Mónica Nunes, sempre presente com os seus conhecimentos científicos, abrindo caminho no meu horizonte científico, agradeço muito a sua ajuda, ensinamentos, companheirismo e amizade, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

À Mestre Teresa Carreira, pela sua amizade, companheirismo e boa disposição ao longo desta jornada.

À sub-coordenadora do laboratório de Microbiologia do Hospital Egas Moniz, Isabel Faria, pela sua compreensão e disponibilização de horário.

Às minhas queridas colegas de mestrado, Joana Calado e Sofia Simões, pela partilha de experiências e amizade.

À minha família pelo seu apoio, em especial ao amor da minha vida, a minha filha Catarina que durante este período cresceu demonstrando ser um ser humano responsável e cheio de amor e compreensão.

A quem me fez sentir o seu amor, pois é este que nos faz viver na alegria e na dor.

“The main goals for the future are to improve specificity in general and sensitivity for diagnosis of early manifestations (stage I and II) of Lyme borreliosis”

“Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe”, Wilske B., 2003

Resumo

A Borreliose de Lyme é uma infecção causada por bactérias (espiroquetas), pertencentes ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, que são transmitidas por mordedura de carrças principalmente do género *Ixodes*. As espécies mais prevalentes na Europa são *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae*. A doença pode afetar diversos órgãos e sistemas de acordo com o tropismo de cada espécie (da pele às manifestações neurológicas). O diagnóstico laboratorial é difícil, sendo necessário desenvolver/implementar novos testes que sejam sensíveis, rápidos e baratos.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de amplificação molecular isotérmica, *Loop-Mediated Amplification* – LAMP, em duplex, para deteção e identificação de quatro das referidas espécies de *Borrelia*, tendo como alvo o gene *flaB*, codificante da proteína flagelina.

Foi desenhado um conjunto de *primers* para cada espécie de *Borrelia*, com 100% de especificidade. Para a otimização das condições de amplificação de DNA pela técnica LAMP, foram escolhidos os *primers* para *B. lusitaniae*. Foram também realizadas reações *nested*-PCR para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rri*) e gene *flaB* e ainda qPCR para este último gene. Após a otimização a técnica foi aplicada a carrças e a amostras humanas (soro e líquido) para deteção/identificação de *Borrelia*.

A amplificação de DNA, mostrou valores diferentes de sensibilidade consoante as espécies, de 2,5pg/μl a 2500pg/μl de DNA para *B. lusitaniae* e *B. garinii* respetivamente e os resultados obtidos com as reações de *nested*-PCR e qPCR variaram de 0,05 a 5pg/μl.

A exatidão da técnica LAMP para *B. lusitaniae* quando comparada com as outras técnicas moleculares foi semelhante, pelo que se admite que com *primers* desenhados para o género *Borrelia*, ter-se-ia obtido melhor sensibilidade para todas as espécies, com a vantagem da reação ocorrer num único tubo em menos de uma hora, com visualização do resultado a olho nu.

Apesar das limitações, a técnica LAMP é uma ferramenta promissora para o diagnóstico laboratorial da Borreliose de Lyme.

Abstract

Lyme borreliosis is an infection caused by bacteria (spirochetes), belonging to *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, that are transmitted through the bite of ticks mainly *Ixodes* genus. The most prevalent species in Europe are *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*. The disease can affect several organs and systems in accordance with the tropism of each species (from skin to neurologic manifestations). Laboratory diagnosis is difficult, being necessary to develop/implement new tests that are sensitive, fast and cheap.

The aim of this study was to develop an isothermal technique of molecular amplification “Loop-mediated amplification” - LAMP, duplex, for detection and identification of four of these *Borrelia* species, targeting the *flaB* gene encoding the flagellin protein.

A set of primers was designed for each *Borrelia* species, with 100% specificity. For DNA amplification by LAMP technique, the *B. lusitaniae* primers were chosen. Nested-PCR reactions for intergenic space 5S(*rrf*)-23S(*rri*) and *flaB* gene, and also qPCR for this gene, were also performed. After optimization the LAMP technique was applied to ticks and human samples (serum and CSF) for detection/identification of *Borrelia*.

DNA amplification, showed variable sensitivity values, depending on the species from 2,5pg/μl to 2500 pg/μl for *B. lusitaniae* and *B. garinii* DNA, respectively, and the results obtained by nested-PCR and qPCR reactions ranged between 0.05 and 5pg/μl.

The accuracy of the LAMP technique to *B. lusitaniae* when compared to other molecular techniques were similar, whereby it is assumed that, with primers designed for *Borrelia* genus, better sensitivity for all species could be obtained, with the advantage that the reaction occurs in a single tube in less than one hour, and the result is visualized at naked eye.

Despite the limitations, LAMP technique is a promising tool for laboratorial diagnosis of Lyme borreliosis.

Índice geral

Resumo	vi
Abstract.....	vii
Índice	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiv
Índice Quadros.....	xv
Lista de Abreviaturas e Siglas	xvi

Índice

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Justificação do tema e objetivos	1
1.2 - Contexto Histórico: Borreliose de Lyme.....	2
1.3 - O agente etiológico: <i>Borrelia</i> – Classificação, Morfologia e Biologia.....	5
1.4 - Vetor e hospedeiro reservatório.....	7
1.5 - Borreliose de Lyme - Características Clínicas vs terapêutica	9
1.6 - Epidemiologia mundial da Borreliose de Lyme	14
1.7 - Epidemiologia da Borreliose de Lyme em Portugal.....	17
1.8 - Diagnóstico laboratorial	20
1.9 - Perspetiva de nova técnica molecular a utilizar no diagnóstico laboratorial.....	24
1.10 - Prevenção da Borreliose de Lyme	26
2 - MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 - Técnica LAMP	27
2.1.1. - Reagentes	28
2.1.2 - Desenho de <i>primers</i>	28
2.1.3 - Otimização das condições de amplificação	31

2.1.4 - Visualização dos produtos de amplificação.....	31
2.1.5 - Sondas para identificação do DNA borreliano amplificado	32
2.1.6 - Determinação da especificidade	33
2.2 - Determinação da sensibilidade das técnicas moleculares.....	34
2.3 - <i>Nested-PCR</i> para o complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	35
2.3.1 - <i>Nested-PCR</i> - Espaço intergénico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rri</i>) do rDNA	35
2.3.2 - <i>Nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i>	37
2.3.3 - Visualização dos resultados de reações de <i>nested-PCR</i>	38
2.4 - PCR em tempo real (qPCR)	38
2.5 - Determinação da exatidão (acurácia) da técnica LAMP	41
2.5.1 - Amostras de Ixodídeos e amostras humanas (soro e LCR)	41
2.5.2 - Método para a determinação da exatidão.....	42
3 - RESULTADOS	44
3.1 – Otimização da técnica LAMP vs diferentes parâmetros	44
3.1.1 - Proporção de <i>primers</i>	44
3.1.2 - Utilização de <i>primers loop</i>	45
3.1.3 - Concentração da DNA polimerase - <i>Bst</i>	45
3.1.4 - Temperatura e concentração de betaína.....	46
3.1.5 - Tempo de amplificação.....	47
3.1.6 - Concentração de MgSO ₄ vs a temperatura.....	48
3.1.7 - Protocolo final (otimizado) da técnica LAMP	49
3.1.8 - Visualização dos produtos de amplificação	50
3.1.9 - Determinação da especificidade da técnica LAMP	51
3.1.10 - Utilização de sondas para identificação do DNA borreliano.....	52
3.2 - Sensibilidade das técnicas moleculares	53
3.2.1 - Sensibilidade da técnica LAMP	56

3.2.2 - Sensibilidade da <i>nested</i> -PCR para o espaço intergénico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rri</i>).....	57
3.2.3 - Sensibilidade da <i>nested</i> -PCR para o gene <i>flaB</i>	57
3.2.4 - Sensibilidade da PCR em tempo real (qPCR).....	58
3.2.5 - Resumo da sensibilidade obtida nas diferentes técnicas moleculares	59
3.3 - Exactidão (acurácia) da técnica LAMP.....	61
4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	63
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
6 - ANEXOS.....	80

Índice de Figuras

Figura 1. Dr. Wilhelm ‘Willy’ Burgdorfer 1925-2014	3
Figura 2. Morfologia de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	5
Figura 3. Representação da estrutura de um espiroquetídeo do género <i>Borrelia</i>	6
Figura 4. Representação esquemática do genoma da espécie <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. ...	6
Figura 5. Representação esquemática da distribuição de espécie de carraças do género <i>Ixodes</i>	7
Figura 6. Representação dos quatro estádios do ciclo de vida das carraças	8
Figura 7. Ciclo enzoonótico do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	8
Figura 8. Aspeto ilustrativo da fixação da carraça na pele	10
Figura 9. Representação da transmissão das espiroquetas durante a refeição sanguínea da carraça	10
Figura 10. Eritema migrante.....	10
Figura 11. Representação das principais manifestações clínicas da BL	11
Figura 12. Imagem ilustrativa de paralisia facial periférica	12
Figura 13. Imagem de Eritema migrante disseminado	12
Figura 14. Imagem de Linfocitoma borreliano.....	12
Figura 15. Imagens exemplificativas de diferentes localizações de casos de ACA.....	13
Figura 16. Representação gráfica da distribuição anual de casos de BL nos EUA, confirmados e prováveis entre 1995 e 2013	14
Figura 17. Localização dos casos de doença de Lyme reportados nos EUA em 2013	15
Figura 18. Representação gráfica da distribuição do número de casos de BL na Europa reportados pela OMS entre 1990 e 2010	15
Figura 19. Distribuição geográfica do número de amostras positivas vs analisadas e casos notificados de BL, por distrito em Portugal Continental e arquipélagos da Madeira e Açores	17
Figura 20. Representação gráfica dos casos notificados de BL em Portugal entre 2009-2012	18
Figura 21. Representação gráfica da distribuição de casos de BL em Portugal de acordo com a faixa etária.....	19
Figura 22. Representação gráfica das principais manifestações clínicas dos doentes com BL em Portugal (1999-2004).....	19

Figura 23. Tubos de cultura em meio seletivo, Barbour-Stonner-Kelly (BSK).....	20
Figura 24. Microfotografia de fundo escuro de borrelíias em cultura.....	20
Figura 25. Representação esquemática do operão que contém os genes que codificam as subunidades do ribossoma das espécies do complexo de <i>B.b.s.l</i>	23
Figura 26. Representação esquemática dos <i>primers</i> da técnica LAMP	24
Figura 27. Representação do local de ligação dos <i>primers loop</i>	25
Figura 28. Representação esquemática da localização dos três pares de <i>primers</i> , da técnica LAMP, na sequência nucleotídica do gene <i>flaB</i> da espécie <i>B. lusitaniae</i>	30
Figura 29. Esquema representativo do rDNA ou gene do rRNA que codifica o ribossoma das espécies de <i>B.b.s.l</i> , com indicação do tamanho dos produtos de amplificação da <i>nested-PCR</i> para o espaço intergênico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>).....	35
Figura 30. Representação esquemática do local de ligação dos <i>primers</i> da <i>nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i>	36
Figura 31. Termociclador “7500 Fast Real-Time PCR System”	39
Figura 32. Representação das diluições de 5ng a 5fg de DNA de <i>Borrelia</i> , ixodídeos e amostras biológicas humanas	40
Figura 33. Diferentes proporções de <i>primers</i> , FIP/BIP vs F3/B3 na reação de LAMP	43
Figura 34. Reação de LAMP com e sem <i>primers loop</i>	44
Figura 35. Diferentes concentrações de enzima <i>Bst</i>	44
Figura 36. Reação de LAMP com DNA de <i>B. lusitaniae</i> e temperaturas de <i>touchdown</i>	45
Figura 37. Reação de LAMP com variação da temperatura mantendo a concentração da Betaína a 1M.....	46
Figura 38. Reação de LAMP a 68°C com betaína 1M para a espécie <i>B. lusitaniae</i>	47
Figura 39. Reação de LAMP com diferentes tempos de amplificação	47
Figura 40. Reação de LAMP com MgSO ₄ 2mM e DNA da espécie <i>B. lusitaniae</i> a diferentes temperaturas.....	48
Figura 41. Visualização a olho nu dos produtos de amplificação resultantes da técnica LAMP	50
Figura 42. Visualização a olho nu (1) e com luz ultravioleta (2) dos produtos de amplificação da técnica LAMP pela adição de <i>SybrGreen</i>	49

Figura 43. Resultados da especificidade das reações de LAMP com os conjuntos de <i>primers</i> de quatro espécies do complexo <i>B.b.s.l.</i>	51
Figura 44. Visualização do sedimento após adição do PEI aos tubos de reação de LAMP	52
Figura 45. Tubos de reação da técnica LAMP, com adição de sondas e PEI	53
Figura 46. Resultados com DNA de culturas de espécies de <i>Borrelia</i> do complexo <i>B.b.s.l.</i> em diluições seriadas	54
Figura 47. Concentrações de DNA das espécies de <i>Borrelia</i> do complexo <i>B.b.s.l.</i> obtidas após extração por hidrólise alcalina	55
Figura 48. Comparação da sensibilidade pela <i>nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i> entre extrações de DNA conservado a -20°C (preto) e extrações extemporâneas de DNA (amarelo)	55
Figura 49. Sensibilidade da técnica LAMP com os <i>primers</i> para a espécie <i>B. lusitaniae</i>	56
Figura 50. Sensibilidade da <i>nested-PCR</i> para o espaço intergênico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>).....	57
Figura 51. Sensibilidade da <i>nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i>	57
Figura 52. Sensibilidade da PCR em tempo real para o gene <i>flaB</i> com DNA de espécies do complexo <i>B.b.s.l.</i> e respetiva curva de calibração	58
Figura 53. Visualização de alguns resultados obtidos através da técnica LAMP em amostras de ixodídeos.....	61
Figura 54. Visualização de alguns resultados obtidos em amostras de soro e LCR através da técnica LAMP	61

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécies do complexo <i>B.b.s.l.</i>	4
Tabela 2. Número de acesso no <i>Genbank</i> da sequência <i>consensus</i> do gene <i>flaB</i> de quatro espécies do complexo de <i>B.b.s.l.</i> , para o desenho de <i>primers</i>	28
Tabela 3. Conjuntos de <i>primers</i> obtidos pelo programa informático “ <i>Primer Explorer V4</i> ” para quatro das espécies do complexo de <i>B.b.s.l.</i> utilizados na técnica LAMP	29
Tabela 4. Condições de reação e variações testadas na técnica LAMP	31
Tabela 5. Sequência das sondas marcadas com fluorocromo para <i>B. lusitaniae</i> e <i>B. garinii</i>	32
Tabela 6. Descrição da origem e do país de quatro estirpes de referência de espécies do complexo <i>B.b.s.l.</i>	33
Tabela 7. Concentrações iniciais de DNA obtido e diluições seriadas de 1:10.....	34
Tabela 8. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados na <i>nested-PCR</i> para o espaço intergênico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) do rDNA do complexo <i>B.b.s.l.</i>	35
Tabela 9. Reagentes e condições de reação da <i>nested-PCR</i> para espaço intergênico 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) do rDNA do complexo <i>B.b.s.l.</i>	36
Tabela 10. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> da <i>nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i> das espiroquetas do complexo <i>B.b.s.l.</i>	37
Tabela 11. Reagentes e condições de reação da <i>nested-PCR</i> para o gene <i>flaB</i> das espiroquetas do complexo <i>B.b.s.l.</i>	37
Tabela 12. <i>Primers</i> , sondas, reagentes e condições de reação da técnica de qPCR para o complexo <i>B.b.s.l.</i> , desenhados e otimizados pelo GBLB.....	38
Tabela 13. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> e sonda para o gene da β -actina para a qPCR.....	39
Tabela 14. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> e sondas para o gene 18S do rRNA para a qPCR	39
Tabela 15. Total de amostras de ixodídeos selecionados de acordo com os resultados obtidos nas duas técnicas de <i>nested-PCR</i>	42
Tabela 16. Protocolo final (otimizado) da técnica LAMP.....	49
Tabela 17. Resumo dos resultados de sensibilidade obtidos nas diferentes técnicas moleculares com DNA de quatro espécies do complexo <i>B.b.s.l.</i>	59

Tabela 18. Resultados obtidos com a técnica LAMP em amostras de ixodídeos e amostras humanas62

Tabela 19. Exatidão da técnica LAMP, valores percentuais de sensibilidade e especificidade62

Índice de Quadros

Quadro 1. Resumo das concentrações de reagentes e condições da reação de LAMP previamente descritos em diversos artigos27

Quadro 2. Representação da forma de cálculo do valor da exatidão de um método experimental42

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACA - Acrodermatite Crónica Atrófica

ARS - Administração Regional de Saúde

B3 - *Backward 3*

BIP - *Backward Inner Primer*

B. burgdorferi s.l. ou *B.b.s.l.* - *Borrelia burgdorferi* sensu lato

B. burgdorferi s.s. ou *B.b.s.s.* - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

BL - Borreliose de Lyme

Bst - *Bacillus stearothermophilus*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEVDI - Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas

cp - *circular plasmids*

Ct - *threshold cycle*

DDO - Doença de Declaração Obrigatória

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EUA - Estados Unidos da América

ELISA - *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

EM - Eritema Migrante (= *Migrans*)

EUCALB - *European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis*

F3 - *Forward 3*

FIP - *Forward Inner Primer*

GLBL - Grupo Leptospirose e Borreliose de Lyme

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IFI - Imunofluorescência indireta

Ig - Imunoglobulina

LAMP - *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*

LB - *Loop Backward*

LCR - Líquido Cefalo-Raquidiano

LF - *Loop Forward*

lp - *linear plasmids*

LPS - Lipopolissacarídeos

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Par de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*

PEI - *Polyethylenimine*

qPCR - *quantative PCR* (PCR em tempo real)

rDNA - *ribosomal DNA*

rRNA - *ribosomal Ribonucleic Acid*

SNC - Sistema Nervoso Central

UEI - Unidade de Ensino e Investigação

UNL - Universidade Nova de Lisboa

WB - *Western Blot*

Unidades de medida

fg - fentograma

ng - nanograma

nm - nanómetro

pg - picograma

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Justificação do tema e objetivos

A doença de Lyme ou borreliose de Lyme (BL) é uma doença cujos agentes são transmitidos por vetores ixodídeos (vulgarmente designados por carraças) envolvendo um ciclo silvático com vários hospedeiros e reservatórios, onde os humanos são considerados intervenientes acidentais. Os agentes desta doença são bactérias (espiroquetídeos) pertencentes ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.s.l.*).

Na Europa, dados publicados no *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), demonstram que os casos de BL têm vindo a aumentar exponencialmente desde 1990, a reforçar esta tendência sabe-se que a sua sub-notificação é uma realidade. Neste continente, as genospecies patogénicas mais frequentes para os humanos são: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B.b.s.s.*), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae* (1). Em Portugal, a BL é uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO), apesar de ser muitas vezes subnotificada (0,04/100 000 habitantes de 2001 a 2005).

Nos últimos anos os testes laboratoriais para o diagnóstico da BL têm melhorado consideravelmente e os médicos e veterinários têm agora disponíveis algumas opções para a deteção serológica da resposta imune (anticorpos), e a deteção molecular de sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) do(s) agente(s) da BL. No entanto, a maioria destes ensaios são bastante dispendiosos, exigindo pessoal qualificado e instrumentação complexa. Assim, torna-se necessário desenvolver tecnologias de diagnóstico simples, padronizadas e acessíveis de modo a serem eficazes e amplamente utilizadas no diagnóstico de rotina da BL, contribuindo para uma avaliação exata da prevalência da doença.

Processos isotérmicos de amplificação de DNA, tais como o *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification* (LAMP), poderão facilitar a integração de metodologias baseadas em DNA, em kits de diagnóstico molecular livres de instrumentação complexa. Nesta técnica é realizada uma amplificação isotérmica isto é, a uma única temperatura não sendo necessário a utilização de termociclador. A deteção do produto de amplificação pode ser determinada através da observação ou medição da turbidez por turbidimetria, causada pela presença de pirofosfato de magnésio em solução que resulta como subproduto de amplificação, ou pela adição de *SYBR Green* observando-se uma mudança de cor sem a utilização de qualquer equipamento (2).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar a técnica LAMP para a detecção e identificação de algumas das genospecies mais prevalentes do complexo *B.b.s.l.* na Europa (*Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae* e *B. burgdorferi* s.s.), como “nova” ferramenta de interesse para o diagnóstico molecular da Borreliose de Lyme.

O gene alvo escolhido foi o *flaB*, localizado no cromossoma linear, que codifica uma proteína endoflagelar (flagelina) característica das espiroquetas, cuja diversidade permite distinguir diversas espécies de *Borrelia* do complexo *B.b.s.l.* (3, 25). Adicionalmente à detecção da presença de DNA de *B.b.s.l.* com a técnica LAMP, pretende-se obter uma identificação molecular das quatro espécies de *Borrelia*, numa primeira fase otimizando as condições de amplificação para cada uma das espécies, para posteriormente se efetuarem dois testes duplex na técnica LAMP. A detecção será efetuada através de um teste imunocromatográfico, para identificar qual a espécie amplificada.

1.2 - Contexto Histórico: Borreliose de Lyme

O nome “doença de Lyme” teve origem na cidade de Lyme em Connecticut, nos Estados Unidos da América (EUA), nos anos 70 do século passado, onde ocorreu um surto de casos clínicos invulgares em crianças com um diagnóstico inicial de artrite reumatóide juvenil. Todas as culturas para os agentes conhecidos por causarem artrites foram negativas, sendo reconhecido que seria uma entidade clínica desconhecida. Epidemiologicamente a situação sugeria tratar-se de agentes transmitidos por um artrópode (4).

Na observação dos casos de doença verificou-se que os ataques de artrite eram recorrentes, tendo as referidas manifestações sido originalmente designada por artrite de Lyme. Mais tarde ficou claro que a artrite era apenas uma das manifestações tardias de uma doença multisistémica, que incluía manifestações dermatológicas, neurológicas e cardíacas, pelo que passou a designar-se por doença de Lyme (4).

Foi na década dos anos 80 (em 1982), que foram descobertas espiroquetas em carraças de corpo duro de Long Island (EUA) por Wilhelm “Willy” Burgdorfer (Figura 1). Este achado determinou assim a etiologia da doença de Lyme, a qual foi confirmada pela cultura destas espiroquetas (bactérias) a partir da pele, sangue e líquido cefalo-raquidiano (LCR) de doentes (5).

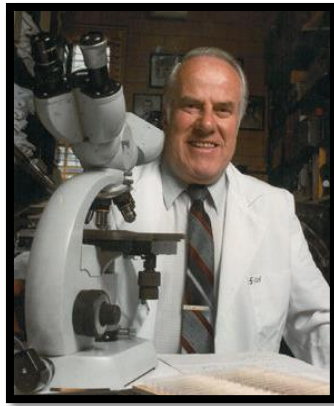


Figura 1. Dr. Wilhelm ‘Willy’ Burgdorfer 1925-2014.

Fonte: http://ravallirepublic.com/news/local/obituaries/article_b3df0fea-7058-11e4-99d6-07039cc768d3.html

Em 1984 as referidas espiroquetas foram designadas como *Borrelia burgdorferi* em homenagem a Wilhelm Burgdorfer (6). A doença de Lyme ou Borreliose de Lyme, é assim, causada por espiroquetas relacionadas entre si e por isso incluídas num grupo designado por complexo *B.b.s.l.*, as quais, por sua vez, são transmitidas por algumas espécies de artrópodes do género *Ixodes*. Atualmente, a BL é a doença infecciosa causada por agentes transmitidos por carraças, mais comum na América do Norte e nos países com clima moderado na Eurásia, tendo a doença grande importância na saúde pública em ambas as regiões (7).

As espécies de *Borrelias* associadas à mordedura de carraça constituem três grupos filogenéticos (1):

1. **O grupo da Borreliose de Lyme**, designado por complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato;
2. **O grupo da febre recorrente**, inclui borrelíias que diferem das que causam a doença de Lyme no que respeita aos seus vetores artrópodes, que são geralmente carraças de corpo mole. As espécies de *Borrelia* que causam a BL têm sido sobretudo carraças de corpo duro, mas existem duas potenciais exceções, as espécies *B. myamotoi* e *B. lonestari*, que parecem estar relacionadas com a febre recorrente e foram isoladas de carraças de corpo duro (3).
3. **O grupo das borrelíias associadas aos répteis**, por exemplo a espécie *Borrelia turcica*;

Na América do norte, a única espécie conhecida de *Borrelia* que causa doença nos humanos é a espécie *B.b.s.s.*. Na Europa conhecem-se já, pelo menos seis espécies suscetíveis de causar doença (*Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* e *B. valaisiana*), originando uma grande variedade de manifestações clínicas (7). Acresce ainda a *B. lusitaniae* que tudo indica ser igualmente uma espécie patogénica, tendo sido isolada pela primeira vez em Portugal, numa biópsia de pele de uma doente (8).

O complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, inclui atualmente pelo menos 20 genospecies confirmadas ou propostas (4, 9), Tabela 1.

Tabela 1. Espécies do complexo *B.b.s.l.*, espécies patogénicas a cor laranja e espécies com potencial patogénico a cor verde.

Adaptado de Rudenko *et al.*, 2012 (9) e Borchers *et al.*, 2015 (4).

Espécie de <i>Borrelia spp</i>	Distribuição geográfica	Referência
<i>B. afzelii</i>	Ásia, Europa	Canica <i>et al.</i> (1993)
<i>B. americana</i>	E.U.A.	Rudenko <i>et al.</i> (2009)
<i>B. andersonii</i>	E.U.A.	Marconi <i>et al.</i> (1995)
<i>B. bavariensis</i>	Europa	Magos <i>et al.</i> (2009)
<i>B. bissetii</i>	Europa, E.U.A.	Postic <i>et al.</i> (1998)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Europa, E.U.A.	Baranton <i>et al.</i> (1992)
<i>B. californiensis</i>	E.U.A.	Postic <i>et al.</i> (2007)
<i>B. carolinensis</i>	E.U.A.	Rudenko <i>et al.</i> (2009b)
<i>B. garinii</i>	Ásia, Europa	Baranton <i>et al.</i> (1992)
<i>B. finlandensis</i>	Finlândia	Casjens <i>et al.</i> (2011)
<i>B. japonica</i>	Japão	Kawabata <i>et al.</i> (1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	Europa, E.U.A.	Margos <i>et al.</i> (2010)
<i>B. lusitaniae</i>	Europa, Norte de África	LeFleche <i>et al.</i> (1997) Collares Pereira <i>et al.</i> (2004)
<i>B. sinica</i>	China	Masuzawa <i>et al.</i> (2001)
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Richter <i>et al.</i> (2006)
<i>B. tanukii</i>	Japão	Fukunaga <i>et al.</i> (1996)
<i>B. turdi</i>	Japão	Fukunaga <i>et al.</i> (1996)
<i>B. valaisiana</i>	Ásia, Europa	Wang <i>et al.</i> (1997)
<i>B. yangtze</i>	China	Chu <i>et al.</i> (2008)
Genomospecie 2	E.U.A.	Postic <i>et al.</i> (2007)

1.3 - O agente etiológico: *Borrelia* – Classificação, Morfologia e Biologia

Os géneros das espiroquetas com interesse médico são: *Borrelia*, *Leptospira* e *Treponema*, estão agrupadas na ordem Spirochaetales, que por sua vez está dividida em duas famílias *Leptospiraceae* e *Spirochaetaceae*, esta última inclui o género *Borrelia* descrito em 1907 por Swellengrebel (10), tendo sido publicada a primeira sequenciação da *B. burgdorferi* s.s. em 1997 (11).

As borrelíias são microrganismos unicelulares com morfologia helicoidal sem parede celular rígida, com 10-30µm de comprimento e 0,2-0,3µm de diâmetro. Devido ao seu reduzido diâmetro não é possível visualizá-las em microscopia de fundo claro, sendo todavia observáveis em microscopia de fundo escuro ou de contraste de fase. Também é possível observá-las com determinadas colorações como a de prata (argêntica) e por imunofluorescência (10, 12), como abaixo representado (Figura 2).

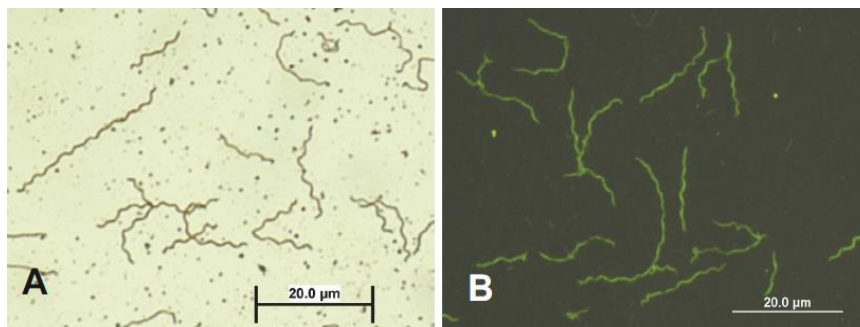


Figura 2. Morfologia de *Borrelia burgdorferi* s.l. Microfotografias com ampliação de 1000x. A - Coloração pela prata; B - Imunofluorescência.
Fonte: Raska *et al.*, 2007 (12).

Estas espiroquetas de acordo com a espécie, possuem um número de flagelos que oscila entre sete (7) a 20, estes endoflagelos ou filamentos axiais estão inseridos em cada extremidade da bactéria, movendo-se sobre a parte média da mesma, designado de espaço periplasmático, sendo responsáveis pela motilidade e morfologia típica destas espiroquetas, e ao contrário de outras bactérias a parede celular não tem um papel determinante na sua morfologia. Estes endoflagelos são essencialmente constituídos por duas proteínas flagelares (flagelinas), a menor designada de FlaA (38kDa) e a maior de FlaB (41kDa), esta última quando inativada observa-se a perda de motilidade da bactéria.

A sua forma helicoidal apresenta em média cinco a sete espiras, de aspeto irregular e de amplitude variável de 2 a 4µm e com as extremidades mais afiladas (10, 12) (Figura 3).

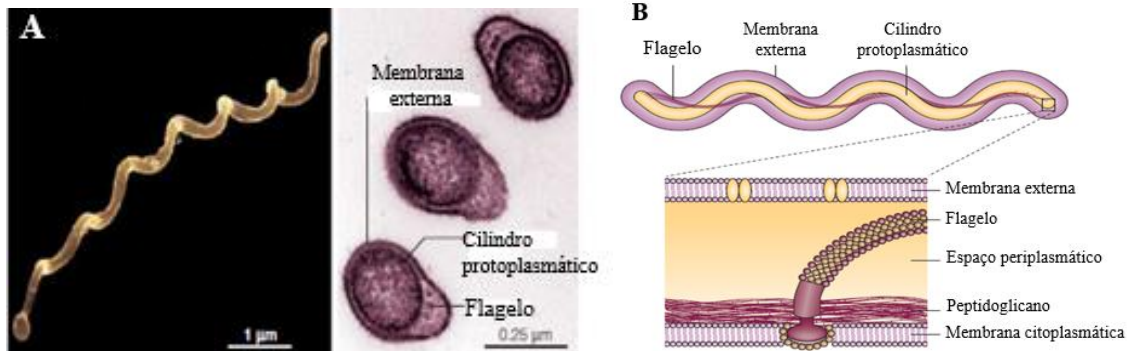


Figura 3. Representação da estrutura de um espiroquetídeo do género *Borrelia*. A - Microfotografia de uma borrelia e visualização de um corte transversal; B - Representação esquemática da estrutura e morfologia; cada flagelo está inserido na membrana citoplasmática atravessando da parede celular (peptidoglicano) para o espaço periplasmático. Adaptado de Rosa *et al.*, 2005 (13).

A composição do envelope celular é semelhante à das bactérias de Gram negativo, no entanto com diferenças significativas, tais como a ausência de lipopolissacarídeos (LPS's) e a abundância em lipoproteínas na membrana celular externa (12).

O genoma das bactérias do género *Borrelia* é característico, consistindo num cromossoma linear com um tamanho aproximado de 1Mb e vários plasmídeos circulares e lineares. Para a estirpe B31 de *B.b.s.s.* foram descritos 21 plasmídeos, sendo nove (9) plasmídeos circulares (cp) e 12 plasmídeos lineares (lp) (12), representados na Figura 4.

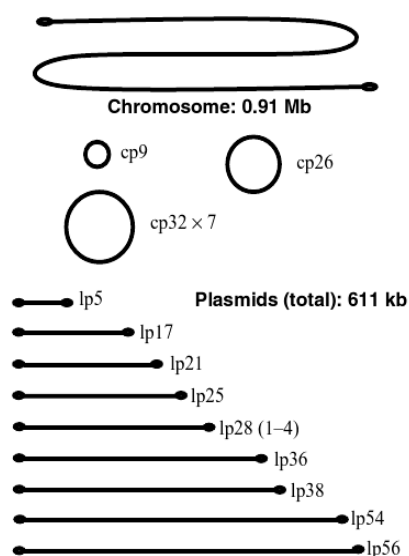


Figura 4. Representação esquemática do genoma da espécie *Borrelia burgdorferi* s.s. estirpe B31.

Fonte: Gray *et al.* 2002 (14)

Foi no ano 2000 que Purser e Norris (12), dividiram os plasmídeos em três grupos:

1. Plasmídeos necessários à virulência;
2. Plasmídeos que não são necessários à virulência e que são perdidos em cultura;
3. Plasmídeos presentes em todos os isolados estudados, que têm genes essenciais para a sobrevivência da bactéria.

1.4 - Vetor e hospedeiro reservatório

As diferentes espécies de *Borrelia* são principalmente transmitidas por quatro espécies de carrças de corpo duro do género *Ixodes*, cuja distribuição mundial está representada na Figura 5 (7):

1. No norte da América - *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*;
2. Na Europa - *Ixodes ricinus*;
3. Ásia e Europa oriental - *Ixodes persulcatus*.

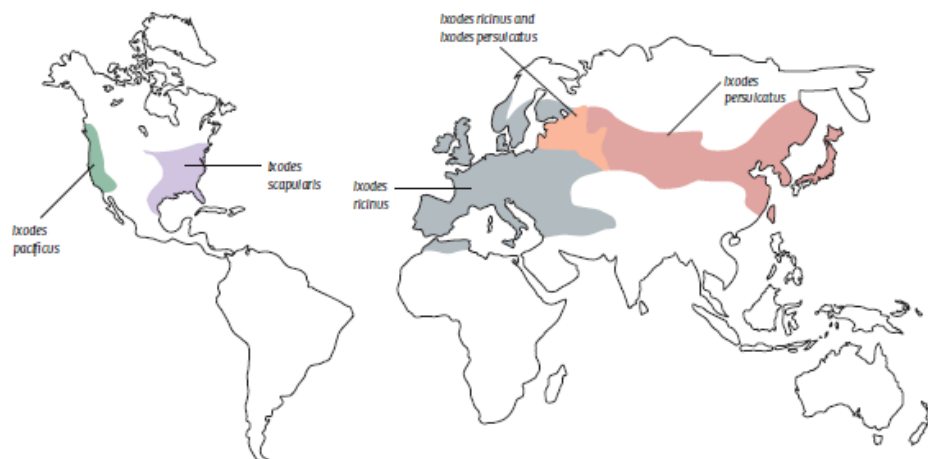


Figura 5. Representação esquemática da distribuição de espécies de carrças do género *Ixodes*. Fonte: Stanek *et al.*, 2012 (7).

Admite-se, no entanto, que a presença dos agentes da borreliose de Lyme esteja relacionada com a dispersão dos seus vetores, que consequentemente pode levar a um aumento de incidência desta doença nessas regiões (1).

As carrças do género *Ixodes*, podem veicular espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* nas glândulas salivares. A capacidade de transmissão da bactéria através da mordedura de uma carrça infetada aumenta com o tempo de fixação daquela ao hospedeiro, sendo baixa antes

das 72 horas, no entanto, a transmissão de *B. afzelii* é possível a partir das oito horas de fixação (15). As carrças têm quatro estádios (Figura 6) no seu ciclo de vida (Figura 7) - ovo, larva, ninfa e adulto, alimentando-se apenas uma vez durante cada estádio em que os machos nunca ingurgitam (7).

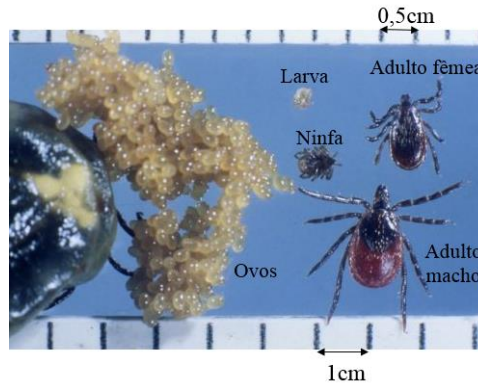


Figura 6. Representação dos quatro estádios do ciclo de vida das carrças (ovos, larva, ninfa e adulto ♂ e ♀).

Adaptado de <http://www.lymediseaseassociation.org/index.php/about-lyme/tick-vectors/photos?start=20>.

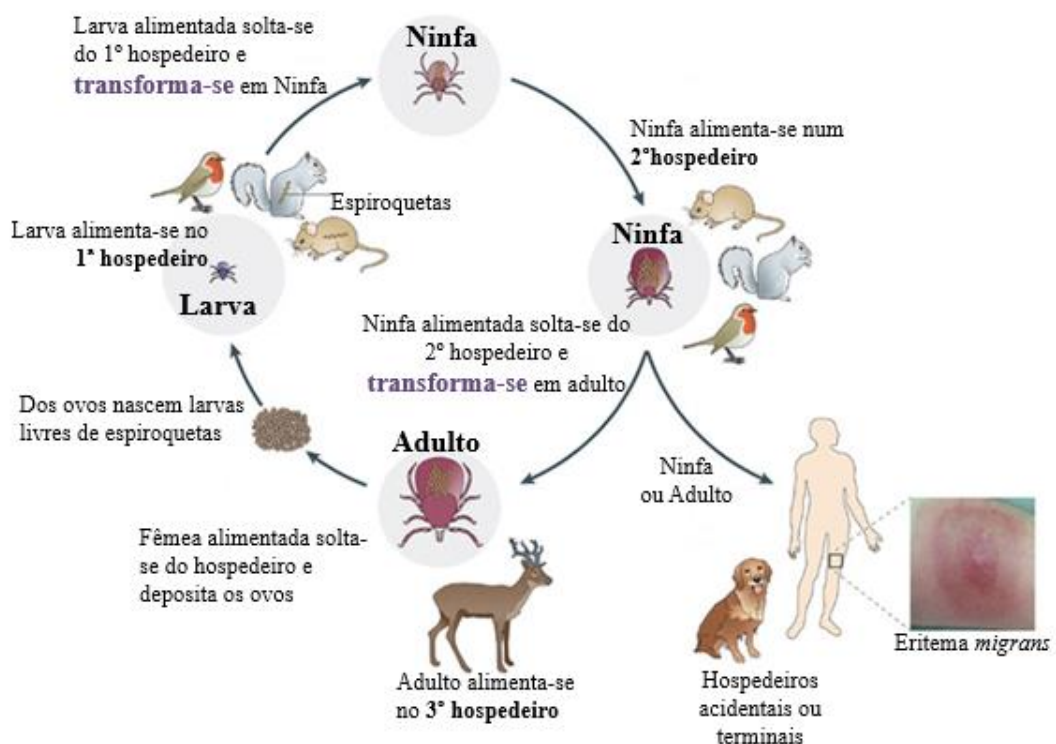


Figura 7. Ciclo enzoontico do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.

Adaptado de Radolf *et al.*, 2012 (16).

A transmissão aos humanos, é mais frequente desde o final de maio até final de setembro, coincidindo com a atividade das ninfas e com o aumento das atividades de ar livre, (profissionais e/ou de lazer) por parte da população, nos locais onde as carraças se encontram (7). As taxas de infecção por bactérias do complexo *B.b.s.l.* são mais elevadas nas carraças adultas do que nas ninfas, no entanto, as ninfas são mais abundantes e muito mais pequenas, sendo mais difíceis de detetar, conseqüentemente mantêm-se mais tempo fixadas aos respetivos hospedeiros. A dose mínima infetante (inoculo) para os humanos é desconhecida, no entanto, como apenas se consegue detetar 20-60 espiroquetas por glândula salivar das carraças, isto sugere que um pequeno inoculo é suficiente para causar infecção (4).

Os principais hospedeiros reservatórios para *Borrelia* spp são os pequenos mamíferos, como os ratos, ratazanas e algumas espécies de pássaros. Na maioria dos habitats das carraças, os veados são essenciais para a manutenção da população destas porque são um dos poucos hospedeiros selvagens que conseguem alimentar um número suficiente de carraças adultas, mas não são reservatórios competentes para as espiroquetas (7). No entanto, existem autores que assumem os veados como reservatórios competentes (12). A associação das diferentes espécies de *Borrelia* com um determinado reservatório depende fortemente da capacidade das espiroquetas resistirem à resposta imune dos hospedeiros. O principal fator para a associação a um reservatório é a produção, por parte do vetor, de componentes específicos que inibem a ação do complemento do hospedeiro (1).

As aves migratórias muito provavelmente desempenham um papel chave na prevalência da BL, uma vez que são não só um dos hospedeiros reservatório de *Borrelia* spp., como também veículo de carraças infectadas para outros locais (1).

1.5 - Borreliose de Lyme - Características Clínicas vs terapêutica

Quando uma carraça se está a alimentar (Figura 8), deposita as espiroquetas na pele do hospedeiro humano ou animal (Figura 9). Mais tarde, as borrelíias disseminam-se a partir do local da mordedura para o sangue ou mesmo através da pele para outras localizações (7).



Figura 8. Aspeto ilustrativo da fixação da carraça na pele.

Fonte: <http://www.vetenskaphalsa.se/modern-teknik-sparar-borreliar/>.

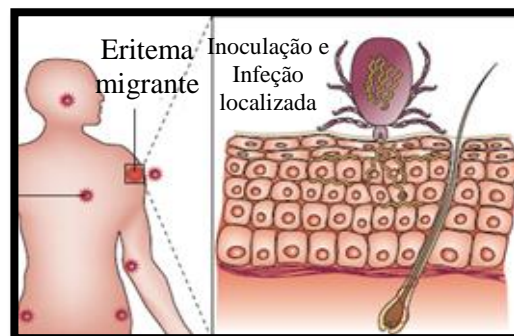


Figura 9. Representação da transmissão das espiroquetas durante a refeição sanguínea da carraça.

Adaptada de Rosa *et al.*, 2005 (13).

Após a transmissão das espiroquetas (borrélias), ocorre uma infecção localizada, que se manifesta por uma lesão na pele designada por Eritema Migrante ou *Migrans* (EM), cuja a lesão cutânea é evidência patognomónica da doença de Lyme, representada na Figura 10, a qual foi pela primeira vez descrita pelo médico sueco Arvid Afzelius em 1909 (6).



Figura 10. Eritema migrante.

Fonte: CDC citado por Radolf *et al.*, 2012 (16).

Esta infecção localizada ocorre em 60-80% dos casos, sendo que numa fase precoce pode ser completamente assintomática ou ocorrer na forma de uma síndrome gripal, com febre, cansaço, dores de cabeça, dores musculares e articulares (17).

Nem todas as bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. têm o mesmo tropismo de difusão sistémica. A espécie *B. burgdorferi* s.s. por exemplo, associa-se com mais frequência às lesões articulares; a espécie *B. garinii* tem um tropismo meníngeo, afetando o sistema nervoso central (SNC), levando a quadros de neuroborreliose e a espécie *B. afzelii* para as manifestações cutâneas como a acrodermatite crónica atrófica (ACA) e linfocitoma

borreliano. As manifestações clínicas na Europa são mais diversas do que na América do norte em consequência da distribuição das diferentes espécies (15).

As principais manifestações clínicas da borreliose de Lyme podem evoluir em três fases, duas precoces e uma tardia (15), como respresentado na Figura 11.

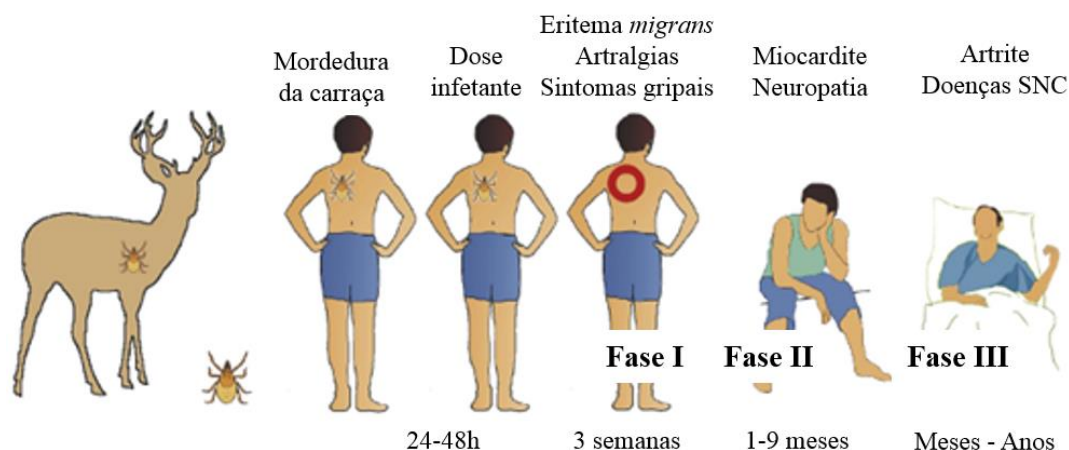


Figura 11. Representação das principais manifestações clínicas da BL, mostrando três fases, fase I e II precoces e fase III tardia. Adaptado de Raska *et al.*, 2007 (12).

Fase primária: Infecção precoce

O EM, em média aparece 7 a 14 dias depois da mordedura da carrapa (no mínimo 24 horas e no máximo 180 dias). As borrelíias encontram-se na zona de progressão da lesão, local onde se deve efectuar a biopsia, se se pretender fazer cultura para isolamento do agente bacteriano (15). Embora o EM acabe por se resolver sem antibioterapia, o tratamento é recomendado para prevenir a disseminação da bactéria e o desenvolvimento de sequelas tardias (7).

Fase secundária: Infecção precoce disseminada

Esta fase corresponde à disseminação sanguínea da bactéria em dias ou semanas após a mordedura. Pode ocorrer sem EM ou concomitantemente a este, em que as manifestações clínicas principais são as seguintes (15):

- **Neuroborreliose precoce**, neste contexto a manifestação mais frequente é a meningorradiculite, que surge geralmente três semanas após a mordedura (15). Também pode ocorrer meningite e paralisia facial periférica unilateral (Figura 12)

ou bilateral, manifestações que podem ocorrer principalmente nas crianças (7, 18). Independentemente do tipo de manifestação neurológica, uma meningite com predomínio de linfócitos (que pode ser muito discreto) é essencial para o diagnóstico (15).

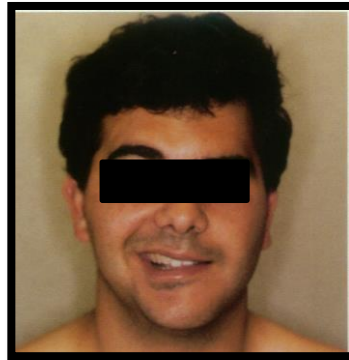


Figura 12. Imagem ilustrativa de paralisia facial periférica.

Adaptado de Klempner e Molloy, 1992 (19).

- **Manifestações reumáticas**, destas a forma mais comum é a monoartrite numa grande articulação (ex. joelho, cotovelo ou tornozelo), de aparecimento brusco, que evolui em dias ou semanas, interrompidos por acessos de remissão mais ou menos completos;
- **Manifestações cutâneas**, a principal como referido é o EM podendo ser múltiplo representando a disseminação sistémica da bactéria no organismo (Figura 13), sendo esta situação mais frequente no norte da América do que na Europa. Podem ainda ocorrer outras manifestações como o linfocitoma borreliano representado na Figura 14.



Figura 13. Imagem de Eritema migrante disseminado.

Fonte: <http://emedicine.medscape.com/article/330178-clinical>.



Figura 14. Imagem de Linfocitoma borreliano.

Fonte: Stanek *et al.*, 2012 (7).

- **Manifestações cardíacas**, surgem geralmente entre as quatro e as oito semanas após a mordedura, ocorrendo um transtorno da condução auriculoventricular, dando origem a um bloqueio típico da cardite de Lyme;
- **Manifestações oftálmicas**, são uma exceção e quando ocorrem podem afetar todos os tecidos do olho, com quadro de conjuntivite, queratite, uveíte entre outras manifestações.

Fase terciária: Infecção tardia

Ocorre geralmente vários meses ou anos após a infecção, constituindo situações menos frequentes (15):

- **Neuroborreliose crônica**, a mais conhecida é a encefalomielite. No LCR, observa-se pleocitose linfocítica e hiperproteínorraquia elevada em todos os casos;
- **Manifestações reumáticas crônicas**, nomeadamente as poliartrites;
- **Manifestação cutânea**, é a ACA, caracterizada por uma lesão inflamatória atrófica definitiva, com alteração da pigmentação, como exemplificado na Figura 15.



Figura 15. Imagens exemplificativas de diferentes localizações de casos de ACA (A, B e C).
Fonte: Stanek *et al.*, 2012 (7).

Esta divisão da doença em fases é frequentemente utilizada mas um pouco teórica e nem sempre é coincidente com o que é observado na prática clínica (2).

Na fase primária da BL, a antibioterapia de primeira linha é a amoxicilina ou doxiciclina e de segunda linha o cefuroxime, todos com tratamento de 14 dias, se ocorrer EM múltiplo passa a 21 dias. A antibioterapia das manifestações da fase secundária ou terciária, são mais prolongados, podendo ser de 14 a 28 dias nas artrites agudas, paralisia periférica facial e ACA e de 30 a 90 dias nas artrites recidivantes ou crônicas (15).

A doxiciclina é o único antibiótico para o qual já foram efetuados ensaios clínicos prospectivos e retrospectivos, tendo sido demonstrada a sua eficácia em tratamentos de apenas 10 dias. No entanto, este antibiótico pode causar fotosensibilidade, sendo contra-indicada para crianças com menos de oito anos e mulheres grávidas ou a amamentar (7).

1.6 - Epidemiologia mundial da Borreliose de Lyme

A BL é a doença mais comum causada por agentes transmitidos por um vetor nas zonas temperadas do hemisfério norte (20). Os casos confirmados de doença de Lyme, ocorrem sobretudo nos EUA e Europa (incluindo a parte europeia da Rússia), muito poucos casos têm origem na Ásia e alguns no norte de África (4).

Nos EUA, a doença de Lyme é de notificação obrigatória desde 1991, o número de casos confirmados reportados aumentou de 9.908 casos em 1992 para um total de 30.000 casos em 2009. Desde então o número de casos estabilizou abaixo dos 25.000 casos confirmados por ano como representado na Figura 16 (4).

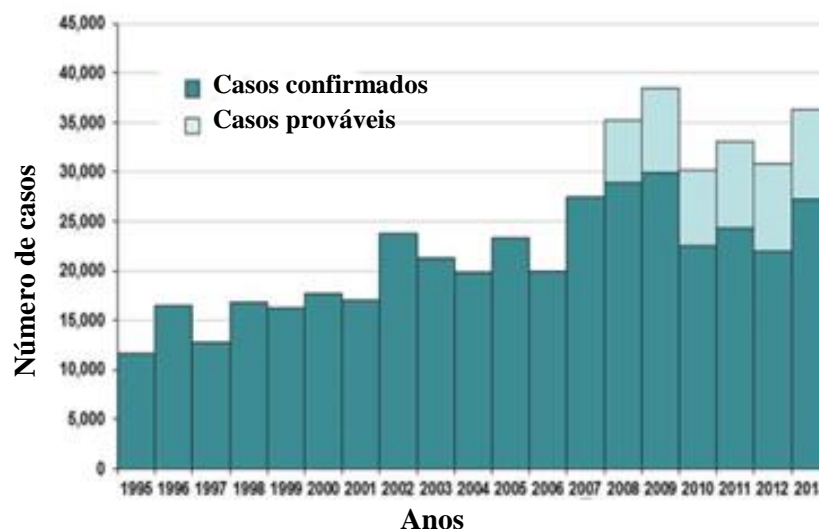


Figura 16. Representação gráfica da distribuição anual de casos de BL nos EUA, confirmados e prováveis entre 1995 e 2013.

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

Em 2011 no noroeste dos EUA, a incidência anual de BL foi de 30 a 80 casos/100.000 habitantes (15), sendo que em 2013 foi de 8,6 casos/100.000 habitantes (Figura 17) de acordo com dados do CDC.

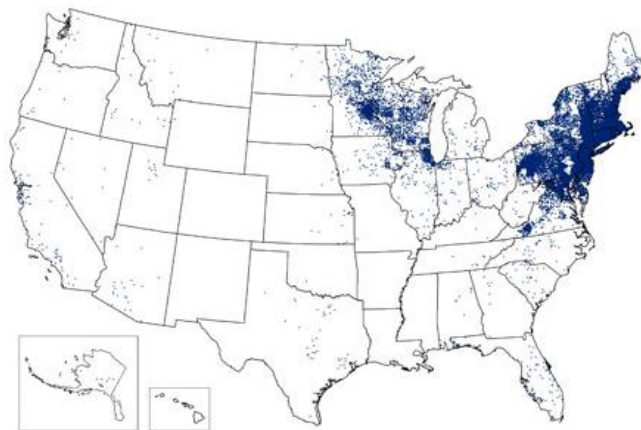


Figura 17. Localização dos casos de doença de Lyme reportados nos EUA em 2013.

Fonte: CDC.

No que respeita à Europa, na maioria dos países a BL não é de notificação obrigatória. A doença, no entanto, é altamente endémica em grande parte deste continente, com uma elevada incidência de casos reportados no sul da Suécia, Lituânia, Alemanha, Áustria e Eslovénia (4). Anualmente na Europa são reportados cerca de 85.000 casos, no entanto, este número é subestimado dado que muitas das infeções de BL não são diagnosticadas (20). Estima-se que o número total de casos na Europa seja três vezes maior do que os casos reportados ao CDC (4).

A incidência anual na Europa parece aumentar de Norte para o sul (7). Verificando-se um claro aumento do número de casos de doença de Lyme reportado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 1990 e 2010 e documentado pelo ECDC como demonstra a Figura 18.

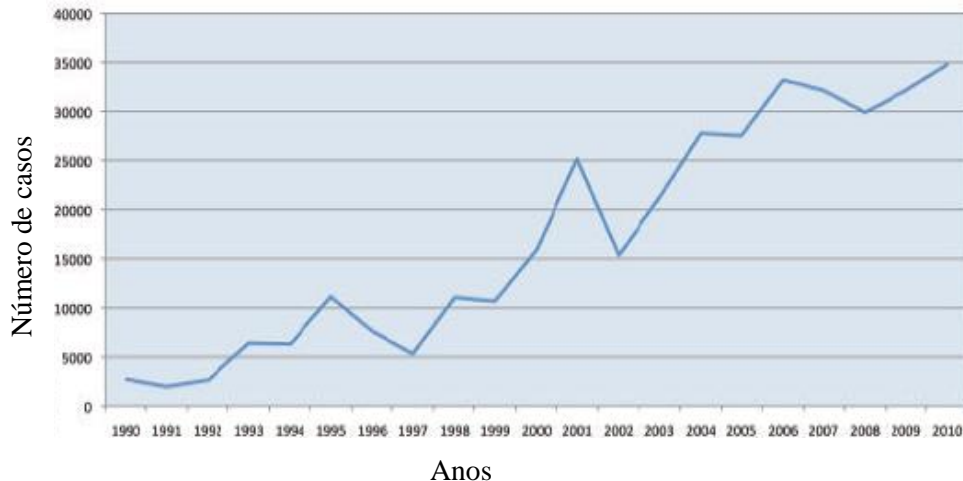


Figura 18. Representação gráfica da distribuição do número de casos de BL na Europa reportados pela OMS entre 1990 e 2010.

Adaptado de <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/world-health-day-2014/documents/factsheet-lyme-borreliosis.pdf>

Os índices de incidência anual na Europa são variáveis consoante os países, com menos de 1 caso/100.000 habitantes em Itália e Portugal e 100 a 200 casos/100.000 habitantes na Áustria e Eslovénia. Em França, a incidência foi calculada em 9,4 casos/100.000 habitantes, no entanto, existem grandes disparidades regionais, com um pico de incidência na Alsácia com 200 casos/100.000 habitantes. Esta grande disparidade na distribuição dos casos, explica-se por uma maior ou menor exposição da população a ixodídeos e pela correlação entre o número de casos humanos e a densidade de ninfas infetadas por quilómetro quadrado. Comprova-se que mesmo nos países onde a incidência da BL é muito baixa, podem encontrar-se áreas de hiperendemia, sendo estas áreas influenciadas pela conjugação de diversos fatores (15):

- O clima;
- A diversidade e abundância de reservatórios selvagens (roedores, esquilos, pássaros);
- A facilidade com que as carraças se podem alimentar (presença de cervídeos);
- A proximidade com o “habitat humano” e a prática de atividades ao ar livre por parte da população.

Relativamente à distribuição da BL por género, nos EUA o género masculino, constitui o grupo populacional mais afetado com 54% de casos; dados europeus sugerem uma ligeira preponderância feminina (4).

A distribuição dos casos de BL por faixa etária é bimodal, com uma incidência mais elevada em crianças dos cinco aos nove anos e em adultos acima dos 50 anos de idade, quer nos EUA quer na Europa (4).

Na Europa, das diferentes apresentações clínicas da BL, o EM é a mais comum (7). No Noroeste de Espanha, o país mais próximo do nosso, num estudo retrospectivo (2006-2013), a incidência anual situou-se entre 2,64 e 11,6 casos/100.000 habitantes. De 108 casos confirmados ocorreu a seguinte distribuição dos sintomas, isoladamente ou combinados (21):

- 67,6% de manifestações neurológicas;
- 47,2% dermatológicas;
- 15,7% reumatológicas;
- 13,9% cardíacas.

1.7 - Epidemiologia da Borreliose de Lyme em Portugal

Em Portugal, o primeiro caso humano de BL foi identificado em 1989 e desde 1999 é uma DDO. As primeiras estirpes isoladas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l., foram obtidas de carraças capturadas no sul do país, tendo o estudo demonstrado a existência de uma nova espécie, *Borrelia lusitaniae* (22).

Estudos posteriores confirmaram a presença de várias espécies do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. em carraças (*B. lusitaniae*, *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. valaisiana*), com diferentes prevalências desde 11,9% em várias regiões, 31,2% na Madeira e 34,7% na região de Grândola. Em todos os estudos realizados em Portugal até 2006, a espécie *B. lusitaniae* foi a mais prevalente (22).

A distribuição geográfica dos casos humanos com BL, diagnosticados a partir de amostras recolhidas durante 15 anos, entre 1990 e 2004, no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas (CEVDI), do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge sediado em Águas de Moura (Setúbal), de doentes diagnosticados segundo os critérios da *European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis* (EUCALB), está representada na Figura 19 (22).



Figura 19. Distribuição geográfica do número de amostras positivas vs analisadas e casos notificados de BL, por distrito em Portugal Continental e arquipélagos da Madeira e Açores. A azul está representada o nº de amostras positivas/nº de amostras analisadas e a preto o número de casos notificados entre 1990-2004. *Fonte: Carvalho et al., 2006 (22).*

A diferença entre o número de casos notificados, representados a preto no mapa e o número de casos confirmados pelo referido laboratório, representados a azul, durante o mesmo período de tempo, demonstra claramente que esta é uma doença subnotificada. A incidência de casos notificados de BL em Portugal é de 0,04 casos/100.000 habitantes, ao se incluírem os dados laboratoriais passa para 0,4 casos/100.000 habitantes, ou seja, 10 vezes mais casos (22). Dados mais recentes, do relatório de DDO's entre 2009-2012, da Direção Geral de Saúde (DGS), estão apresentados na Figura 20, num total de 20 casos notificados de BL pela Administração Regional de Saúde (ARS) no referido período.

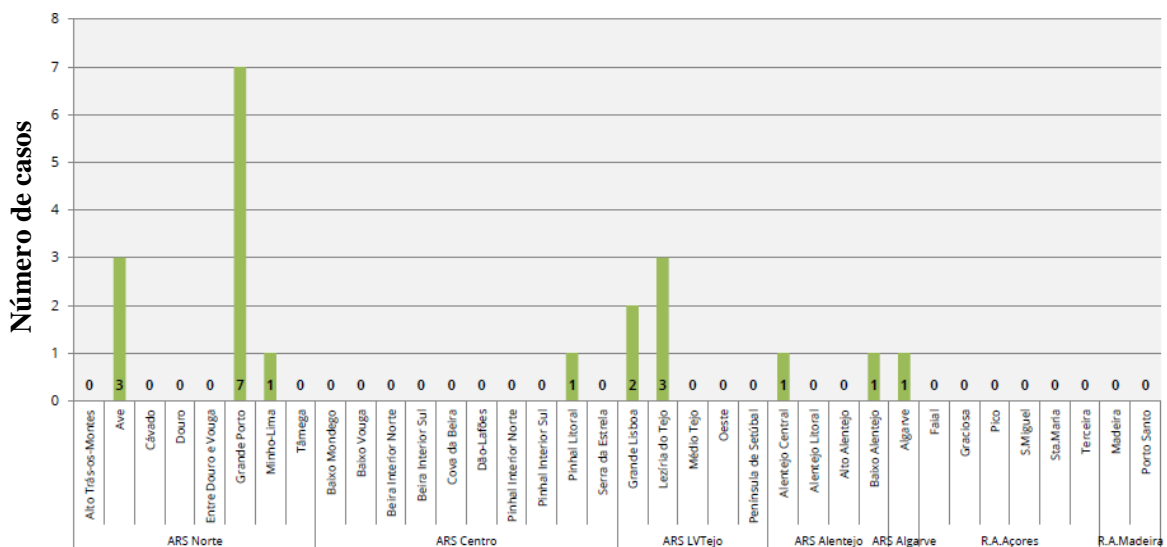


Figura 20. Representação gráfica dos casos notificados de BL em Portugal por regiões entre 2009-2012. *Fonte: Tabela original in relatório DGS.*

Relativamente à distribuição por género, existem mais casos em doentes do género feminino 53,5% comparativamente com o verificado em doentes do género masculino com 46,5%. No que respeita à faixa etária mais afetada situa-se entre os 35-44 anos o que corresponde a cerca de 21,3% dos casos afetados pela doença (Figura 21) (22).

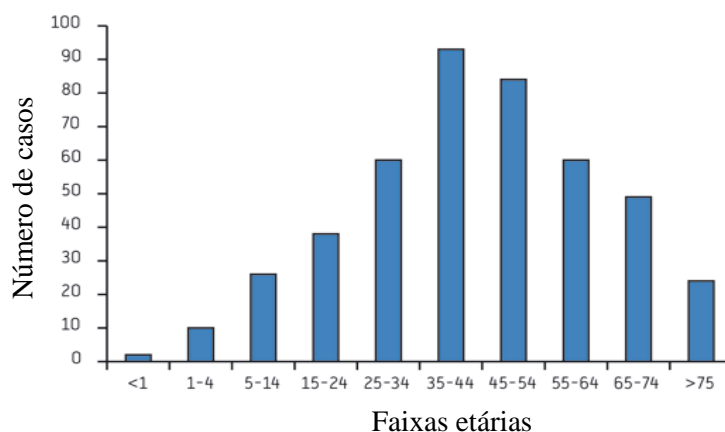


Figura 21. Representação gráfica da distribuição de casos de BL em Portugal de acordo com a faixa etária, no período entre 1999-2004.
Fonte: Carvalho et al, 2006 (22).

No que respeita à distribuição dos sinais clínicos dos doentes com BL (Figura 22), a manifestação clínica mais frequente foi do foro neurológico seguida de manifestações inespecíficas como sintomas hepáticos, mialgias, sintomas oculares e febre, afeções dermatológicas e ainda articulares e cardíacas (22).

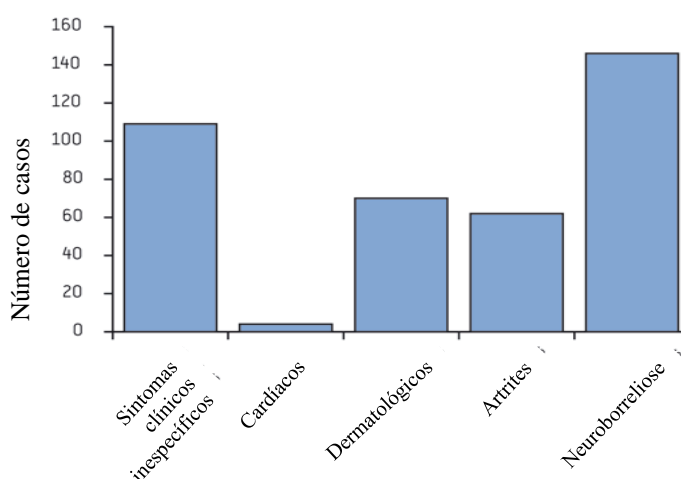


Figura 22. Representação gráfica das principais manifestações clínicas dos doentes com BL em Portugal (1999-2004).
Fonte: Carvalho et al., 2006 (22).

1.8 - Diagnóstico laboratorial

A cultura das espiroquetas em meio seletivo Barbour-Stonner-Kelly (BSK), a partir de amostras biológicas continua a ser o método “Gold standard”, para um diagnóstico inequívoco de BL (18). As culturas em meio líquido são geralmente incubadas a 30-34°C sob condições microaerófilas. As culturas são incubadas durante um período nunca inferior a 12 semanas, devido ao prolongado tempo de geração da espiroqueta (7 a 20 horas ou mais) (23, 24). Quando ocorre crescimento bacteriano existe uma alteração de pH que é detetado pela mudança de cor do indicador do meio, de rosada para amarela (Figura 23). A confirmação da presença das espiroquetas faz-se pela observação de uma gota de sobrenadante da cultura em microscopia de campo escuro (Figura 24).



Figura 23. Tubos de cultura em meio seletivo, Barbour-Stonner-Kelly (BSK) mostrando crescimento bacteriano. *Fonte:* Fotografia da autora.

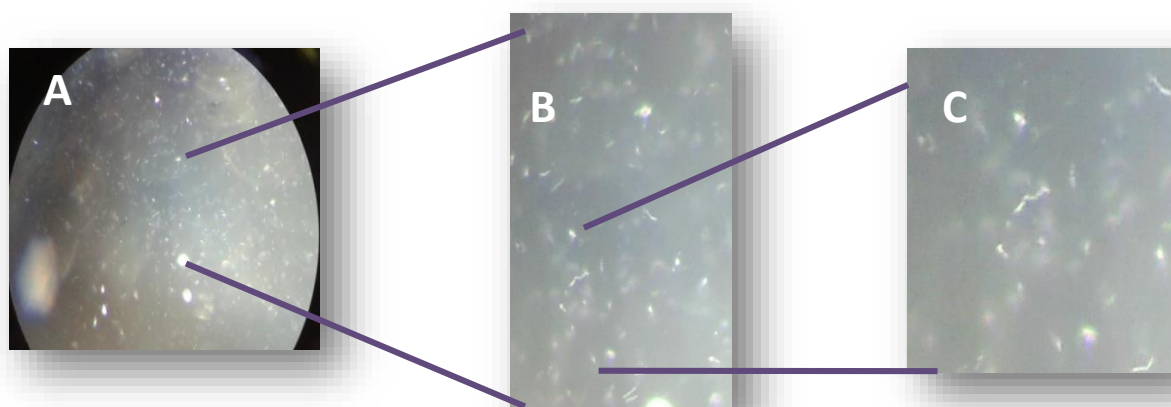


Figura 24. Microfotografia de fundo escuro de borrelíias em cultura (400x):
A - Fotografia original; B e C - Ampliações de pormenor da fotografia original.
Fonte: Fotografia da autora.

A observação de morfologia suspeita de ser uma espiroqueta deve ser confirmada pela demonstração de reatividade com anticorpos monoclonais ou por detecção de sequências específicas de DNA, utilizando a metodologia de PCR (23).

No entanto, a sensibilidade da cultura é altamente variável de menos de 1% na artrite de Lyme a 70% nas lesões de pele com EM, este facto deve-se ao baixo número de espiroquetas viáveis presentes nas amostras a par do crescimento fastidioso das estirpes de *B.b.s.l.*. Logo, resultados negativos não excluem infeções ativas. Por esta razão a cultura não é utilizada como primeira linha para suportar o diagnóstico clínico, mas é útil para confirmação do agente etiológico e para estudos epidemiológicos (18).

O diagnóstico de BL pode ser feito com base nos sintomas clínicos apresentados pelo doente que tenha uma história de exposição à carraça ou por ter viajado para uma área geográfica onde o género *Ixodes* é endémico (24).

Geralmente a serologia é a primeira e frequentemente a única abordagem disponível para o diagnóstico da BL, apesar das dificuldades e controvérsias relativamente a estes testes, estes apresentam uma sensibilidade e uma especificidade aceitáveis. No entanto, tem de se considerar as suas limitações. Por um lado na BL precoce, especialmente no EM e neuroborreliose inicial, pode não ocorrer a produção de anticorpos, devido ao facto de nestes doentes a seroconversão poder estar ausente devido a antibioterapia empírica. Por outro lado, uma resposta específica de anticorpos pode persistir meses ou mesmo anos depois do tratamento bem sucedido da infeção, razão pela qual, o acompanhamento dos títulos de anticorpos em doentes em tratamento não é uma abordagem confiável para a monitorização do sucesso do mesmo (18).

Na maior parte dos países da Europa, para a serologia de BL, utiliza-se uma estratégia em duas etapas, envolvendo um teste de *screening* inicial, geralmente um teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou de Imunofluorescência Indireta (IFI), seguido de um teste de *Western Blot* (WB) ou imunoblot para as amostras com resultado positivo ou duvidoso na abordagem anterior, sendo este algoritmo recomendado pelo CDC. Importa no entanto referir que em qualquer das técnicas de rastreio se podem obter resultados falso

positivos ou negativos devido, a adoção de níveis de “*cut-off*” inadequados, a reação cruzada com outros anticorpos circulantes nomeadamente de doenças autoimunes e no caso do WB critérios de interpretação inapropriados (18).

No âmbito molecular, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permite a deteção de uma pequena quantidade de DNA da bactéria em amostras humanas, de animais hospedeiros/reservatório e vetores. A deteção de DNA das espécies do complexo *B.b.s.l.*, foi realizada pela primeira vez em 1989 por Rosa & Schwan e desde então, tem-se trabalhado na seleção de genes de *Borrelia* como alvos de amplificação. São já vários estes alvos, quer localizados no cromossoma único da bactéria quer nos plasmídeos. Geralmente são utilizados genes que codificam proteínas, como o gene *flaB* que codifica a flagelina localizado no referido cromossoma e genes como o *ospA ospB*, e *ospC* que codificam proteínas de superfície (*outer surface protein*), com o mesmo nome, localizados nos plasmídeos. As sequências de genes em plasmídeos que codificam proteínas de superfície, têm demonstrado uma grande variabilidade, logo, são pouco úteis para a identificação das espiroquetas de *Borrelia* spp. (25). Está descrito que com alvos plasmídicos se obtém maior sensibilidade, uma vez que os plasmídeos se dissociam das espiroquetas e podem persistir nos tecidos e líquidos orgânicos, no entanto podem originar falsos positivos que não refletem a doença ativa, assim, os alvos cromossómicos predizem melhor os organismos viáveis (24).

Outros alvos genéticos importantes são os genes que codificam o rRNA de ambas as subunidades ribossomais como o *rrs* que codifica a pequena subunidade 16S e a região intergénica não codificante entre os genes *rrfA* e *rrlB* do rDNA (Figura 25) (25). Esta região intergénica é única no género *Borrelia* devido à organização dos genes do rRNA dispostos em “*tandem*” estando os genes das subunidades 23S (*rrl*) e 5S (*rrf*) repetidos (26).

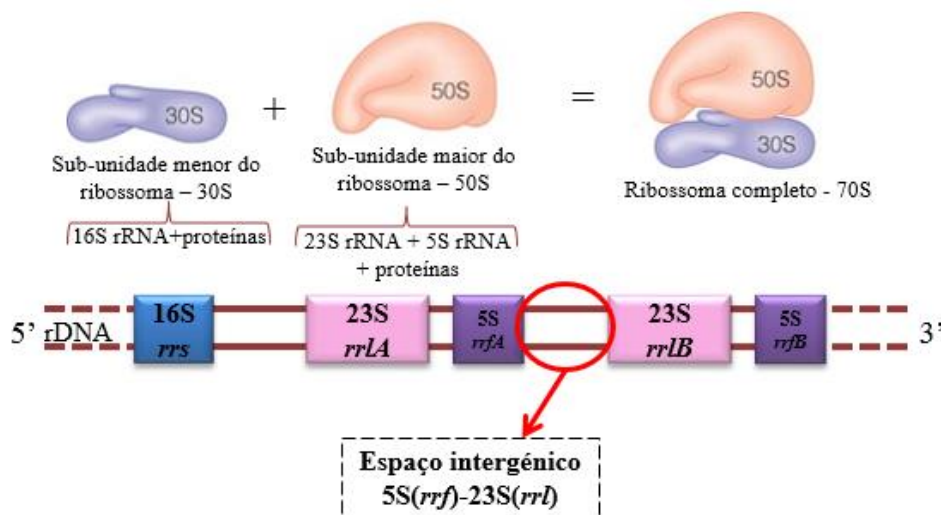


Figura 25. Representação esquemática do operão que contém os genes que codificam as subunidades do ribossoma das espécies do complexo de *B.b.s.l.* com a indicação do espaço intergênico utilizado como alvo de amplificação molecular.

Fonte: Esquema da autora.

Stanek e colaboradores em 2011, refere que com a técnica de PCR se consegue detetar DNA em mais de 50% de amostras de líquido sinovial de doentes não tratados, em 50-70% de biopsias de pele em doentes com EM e ACA o que é raro ser conseguido no soro, 15-30% em amostras de LCR de doentes com neuroborreliose de Lyme aguda (18).

Existem dois aspetos negativos apontados às técnicas de PCR, a falta de padronização do alvo a amplificar, neste caso para a deteção de *Borrelia* spp., tornando impossível a comparação entre os resultados obtidos neste contexto, entre laboratórios (25) e o facto de os métodos de PCR, não serem capazes de estabelecer uma relação direta entre infeção ativa ou não. Apesar disso, desde que conhecida a epidemiologia e a evolução das manifestações clínicas do doente cujo material biológico é sujeito à técnica de PCR, esta pode ser um suporte de diagnóstico muito útil em situações onde outros testes não foram suficientemente robustos (18).

Relativamente à identificação molecular das espécies de *Borrelia*, esta pode ser efetuada através da sequenciação dos fragmentos de genes amplificados nas técnicas de PCR (27) ou através de uma técnica largamente utilizada, a PCR-RFLP (PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) por exemplo, para o espaço intergênico entre os genes ribossomais *rrfA* e *rrlB*, conseguindo distinguir oito espécies genómicas do complexo *B.b.s.l.* (28).

1.9 - Perspetiva de nova técnica molecular a utilizar no diagnóstico laboratorial

Um dos grandes desafios da atualidade é conseguir utilizar-se as técnicas moleculares de uma forma o mais simplificada possível. A técnica de PCR requer um termociclador, que é só por si um equipamento dispendioso, necessita de condições especiais de trabalho e profissionais treinados. Por esta razão, novos métodos de diagnóstico molecular isotérmicos estão a ser desenvolvidos como alternativa. Um desses métodos é o *Loop-mediated isothermal Amplification* (LAMP) sendo este um bom candidato para substituir/complementar a PCR como ferramenta de diagnóstico molecular por, após otimização, ser simples, específico e de deteção rápida, não necessitando de muitos recursos no laboratório, apenas um banho-maria (29).

Na técnica LAMP a amplificação dos ácidos nucleicos ocorre numa reação única a uma temperatura constante, 60-65°C, com uma polimerase de DNA, a *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*), com capacidade de separar as cadeias de DNA à medida que a polimerização acontece. Utiliza quatro *primers* diferentes: dois *primers* internos e dois *primers* externos, representados no esquema da Figura 26 (2).

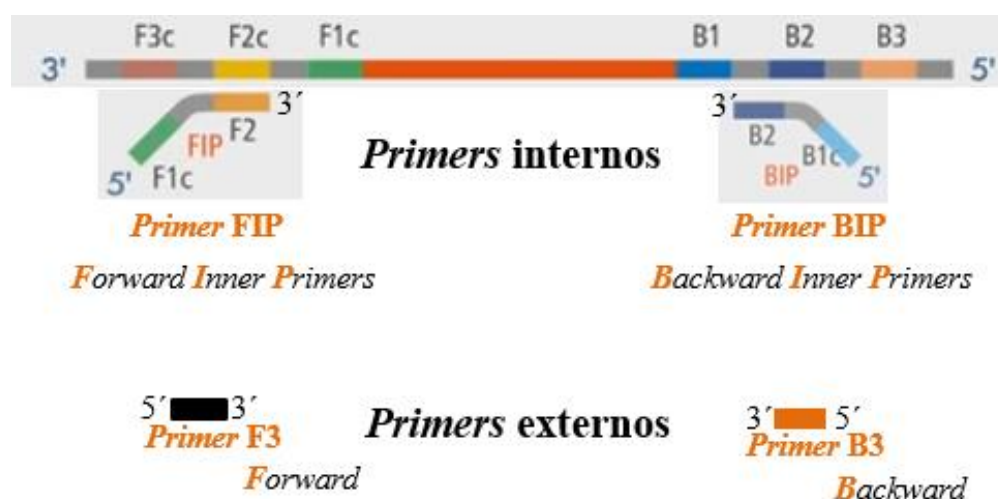


Figura 26. Representação esquemática dos *primers* da técnica LAMP.

Adaptado de <http://www.youtube.com/watch?v=ZXq756u1msE>

Em 2002, Nagamine e colaboradores, demonstraram que a adição de *primers loop*, *Loop Forward* (LF) e *Loop Backward* (LB), representados da Figura 27, podem reduzir para metade o tempo de reação relativamente ao método inicial de LAMP de Notomi e

colaboradores em 2000, aumentando a sensibilidade do método. Assim, a técnica LAMP ao utilizar um conjunto de quatro ou seis *primers* para amplificar seis ou oito regiões na sequência alvo, possui maior especificidade, sensibilidade e rapidez (29).

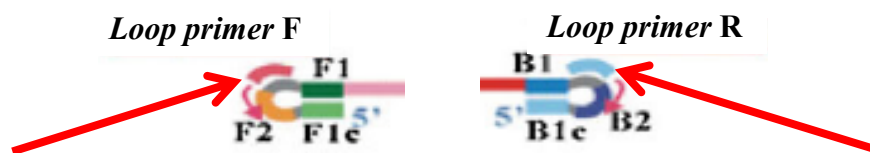


Figura 27. Representação do local de ligação dos *primers loop*.
Adaptado de Parida *et al.*, 2008 (61).

Yang e colaboradores em 2013, publicaram um trabalho com a aplicação da técnica LAMP para o género *Borrelia* tendo como alvo o gene 16S (*rrs*) do rRNA aplicado a carraças (30). Como foi anteriormente referido, com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma técnica LAMP mas para outro alvo, o gene *flaB*, que codifica uma das proteínas flagelares.

A escolha recaiu neste gene uma vez que a análise filogenética baseada na sequência do gene *flaB* consegue distinguir várias espécies do complexo *B.b.s.l.* (3, 28). Yang e colaboradores em 2012, haviam concluído que o referido gene era mais sensível do que o observado para outros genes como *ospA*, *rss* e *p66* (31). Em 2010, outros autores (Wodecka e colaboradores), já haviam chegado à mesma conclusão após terem comparado os resultados da PCR para os genes *flaB*, *rrs* e região não codificante *rrs-rrlA* (25), ainda neste trabalho estes últimos autores aplicaram a técnica de PCR-RFLP aos mesmos genes, e concluíram que o gene *flaB* era o mais eficaz na identificação das espécies do complexo *B.b.s.l.* incluindo a espécie *B. miyamotoi*.

Assim neste trabalho, além da deteção das espécies do complexo *B.b.s.l.* com a técnica LAMP, pretendeu-se conseguir uma identificação molecular das quatro genospecies mais prevalentes em Portugal através da utilização de conjuntos de *primers* específicos para cada uma das espécies.

1.10 - Prevenção da Borreliose de Lyme

A prevenção de BL baseia-se essencialmente em dois aspetos principais (15):

- Evitar a mordedura das carraças, usando sobretudo roupa de cor clara e repelentes;
- Caso ocorra a mordedura, a carraça deve ser retirada puxando-a perpendicularmente e rodando no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio. Não se recomenda a utilização de vaselina, álcool, éter ou uma chama porque estes induzem *stress* à carraça estimulando a secreção de saliva, o que aumenta o risco de transmissão da bactéria. Se ocorrer numa zona endémica, pode ser efetuada profilaxia antibiótica com uma só dose de doxiciclina.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Técnica LAMP

A técnica LAMP é um método de amplificação de ácidos nucleicos baseado no princípio da separação de cadeias de DNA utilizando uma temperatura constante entre 60°C e 65°C (reação isotérmica). Este método utiliza um conjunto de quatro ou seis *primers* e uma DNA polimerase com capacidade de separação das cadeias de DNA enquanto polimeriza uma nova cadeia. Ocorrem reacções cíclicas que resultam na obtenção de cerca de 10⁹ cópias do DNA alvo em menos de uma hora (32), no final da reacção a temperatura é elevada entre os 80°C e os 90°C para inativação da enzima.

Após pesquisa bibliográfica sobre esta técnica aplicada a diferentes microrganismos, construiu-se uma tabela resumo que inclui os reagentes, condições e concentrações mais comuns utilizadas por outros investigadores (2, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38). Estas referências serviram assim de base para se avançar com a otimização da técnica LAMP dirigida ao diagnóstico da BL, em que as primeiras reacções se efetuaram com as condições assinaladas a negrito no Quadro 1

Quadro 1. Resumo das concentrações de reagentes e condições da reacção de LAMP previamente descritos em diversos artigos.

Reagentes	Concentrações
<i>Primers</i> BIP e FIP	0,8µM; 1,6µM; 0,4µM
<i>Primers</i> B3 e F3	0,2µM; 0,5 µM; 0,1µM
<i>Primers loop</i>	0,8µM; 0,2µM
Nucleótidos (dNTPs)	0,4mM; 1mM; 1,4mM; 2,8mM
Betaína	0,8M; 1M; 1,6M
MgSO ₄	4mM; 6mM; 2mM; 8mM; 16mM
Enzima <i>Bst</i>	0,32U; 6U; 8U
Condições	
Temperatura	60 °C; 63°C; 65°C
Tempo de reacção	30; 40; 60 e 90 minutos

2.1.1. - Reagentes

- **Tampão isotérmico** que acompanha a enzima (new England BioLabs™) é 10x concentrado, sendo diluído a 1:10 para concentrações finais de 20mM Tris-HCL, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Tween 20 e pH8.8 a 25°C;
- **Sulfato de Magnésio** (MgSO₄) a 100mM (new England BioLabs™) - O magnésio é um co-fator da DNA polymerase. Em concentrações elevadas estabiliza a cadeia dupla de DNA evitando a sua desnaturação completa, e pode estabilizar as ligações parciais e incorretas dos *primers* à cadeia molde do DNA, diminuindo a especificidade da reação (39);
- **Betaína** a 5M da Sigma-Aldrich® - Esta tem como finalidade reduzir a formação de estruturas secundárias nas regiões do DNA ricas nos nucleótidos guanina e citosina melhorando a amplificação do DNA (40);
- **Nucleótidos**, designados de dNTPs - NZYMix a 10mM da Nzytech;
- **DNA polimerase**, “*Bst 2.0 Warm Start large fragment*” de oito unidades (8U), (new England BioLabs™) - Corresponde ao fragmento maior da proteína DNA polimerase da espécie *Bacillus stearothermophilus*, tem atividade de polimerase 5’-3’ com capacidade de separação de cadeias, não tendo porém atividade de exonuclease 3’-5’. A atividade desta enzima está inibida abaixo dos 45°C.

2.1.2 - Desenho de *primers*

Várias sequências do gene da flagelina das principais espécies de *B. burgdorferi* s.l. (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. lusitaniae*), provenientes de países Europeus, foram selecionadas no *NCBI-GenBank*. Estas foram alinhadas através do programa informático, “BioEdit” versão 7.2.5, para a seleção da sequência que melhor representava cada uma das espécies, ou seja, as sequências consensus, que se apresentam na Tabela 2.

Tabela 2. Número de acesso no *Genbank* da sequência *consensus* do gene *flaB* de quatro espécies do complexo de *B.b.s.l.*, para o desenho de *primers*.

Espécie	Nº de acesso no <i>Genbank</i>	Comprimento
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	X15661	1011pb
<i>Borrelia garinii</i>	DQ650333	604pb
<i>Borrelia afzelii</i>	DQ016619	604pb
<i>Borrelia lusitaniae</i>	D82856	987pb

Com as sequências consensus, efetuou-se um novo alinhamento, de forma a analisar-se as zonas homólogas e heterólogas, para o desenho de um conjunto de *primers* para cada espécie. A zona de interesse selecionada, com cerca de 300pb, para o desenho dos *primers* para a técnica LAMP, apresentava uma heterologia que se admitiu ter um número suficiente de nucleótidos diferentes entre as espécies para a sua distinção. O desenho dos *primers* foi efetuado com recurso ao programa “Primer Explorer V4” (<http://primerexplorer.jp/e/>), de acordo com os critérios estabelecidos em 2000 por Notomi e colaboradores (2), Tabela 3 e Figura 28.

Tabela 3. Conjuntos de *primers* obtidos pelo programa informático “Primer Explorer V4” para quatro das espécies do complexo de *B.b.s.l.* utilizados na técnica LAMP.

Espécie	Primers	Designação do primer	Sequência
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Forward Inner Primer</i> (F1c-F2)	FIP B1	5'-ATCTTGATTGCTCCACATG- AACTCACCAGCATCACTTTCAGG-3'
	<i>Backward Inner Primer</i> (B2-B1c)	BIPB1	5'-ATGTTGCAAATCTGTTTTCTGGT- GGCTCCTTCTTGTTGAACAC-3'
	<i>Forward 3</i>	F3B1	5'-AGCTTGGAATGCAACCTG-3'
	<i>Backward 3</i>	B3B1	5'-CTTGAGAAGGCGCTGTAG-3'
	<i>Loop Forward</i>	LFB1	5'-CTCAAAGTCCAAGAAGCTTGAGAT-3'
	<i>Loop Backward</i>	LBB1	5'-GGGAGCTCAAGTTGCTCAGACTG-3'
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Forward Inner Primer</i> (F1c-F2)	FIPBa	5'-TTCATCTTGATTGCTCCACATG- AACACACCAGCATCACTTTC-3'
	<i>Backward Inner Primer</i> (B2-B1c)	BIPBa	5'-AGCTAATGTTGCAAATCTTTTTGCT- CTTCTTCTTGAGCACCCCTC-3'
	<i>Forward 3</i>	F3Ba	5'-AGCTGAAGAGCTTGGAATG-3'
	<i>Backward 3</i>	B3Ba	5'-TTGAGTAGGTGCTGTAGC-3'
	<i>Loop Forward</i>	LFBa	5'-AGTCCAAGAAGCTTGAGATCCT-3'
	<i>Loop Backward</i>	LBBa	5'-GGAGCTCAAGCTGCTCAGGC-3'
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Forward Inner Primer</i> (F1c-F2)	FIPBg	5'-TCACCAGAGAATAGATTTGCAA- CATGAGCAAATCAAGATGAAGCG-3'
	<i>Backward Inner Primer</i> (B2-B1c)	BIPBg	5'-ACCTGTTCAAGAAGGAGCTCA- AATTAACTCCACCCTGAGAA-3'
	<i>Forward 3</i>	F3Bg	5'-TCTGGACCTTAAGAGTTCA-3'
	<i>Backward 3</i>	B3Bg	5'-GATGTATTAGCGTCAACTGTG-3'
	<i>Loop Forward</i>	LFBg	5'-TTAAGTCCAAGAAGCTTGAGATC-3'
	<i>Loop Backward</i>	LBBg	5'-TCTGGTGAAGGAGCTCAGGCT-3'

Tabela 3. Conjuntos de *primers* obtidos pelo programa informático “Primer Explorer V4” para quatro das espécies do complexo de *B.b.s.l.* utilizados na técnica LAMP (continuação da página anterior).

Espécie	Primers	Designação do primer	Sequência
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Forward Inner Primer (F1c-F2)	FIPBb	5'-GGTTGCTCCAACATGAACTCTTAA-AACACACCAGCATCACTTTC-3'
	Backward Inner Primer (B2-B1c)	BIPBb	5'-GCAGCTAATGTTGCAAATCTTTTCTGAACACCCTCTTGAACCG-3'
S.S.	Forward 3	F3Bb	5'-AGCTGAAGAGCTTGGAAATG-3'
	Backward 3	B3Bb	5'-GTTGAGCTCCTTCCTGTT-3'
	Loop Forward	LFBb	5'-CCAAGACGCTTGAGACCCT-3'
	Loop Backward	LBBb	5'-GAGGGAGCTCAAACCTGCTCAGG-3'

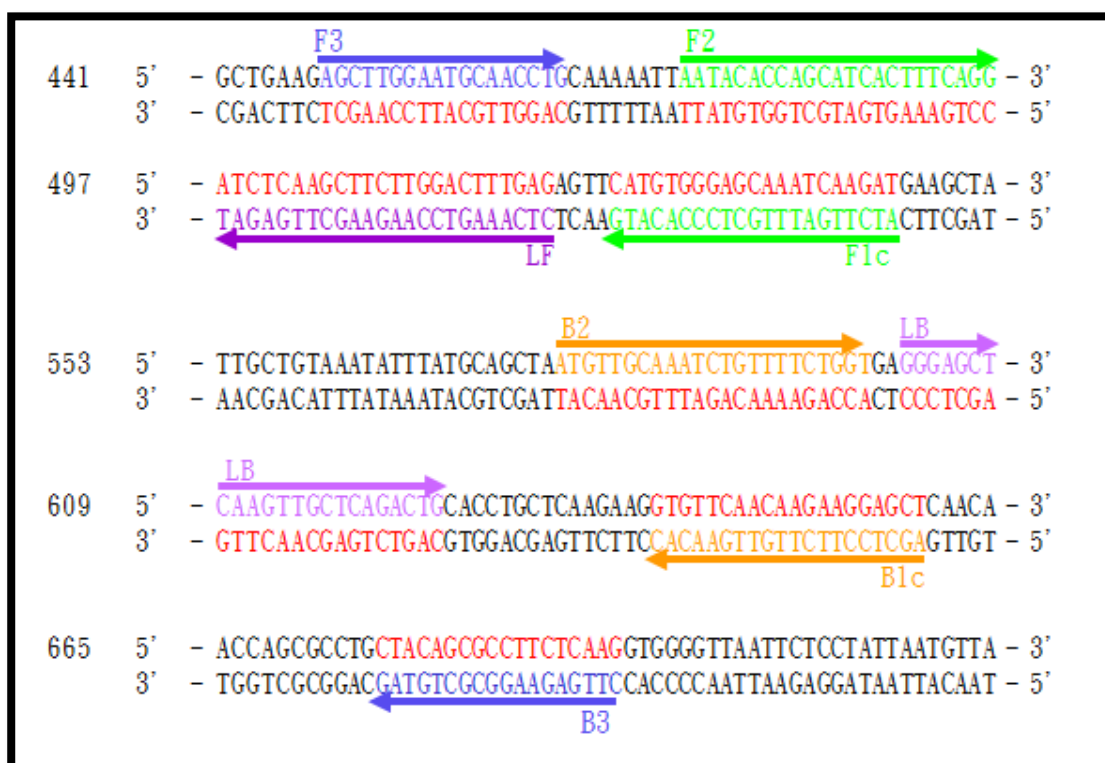


Figura 28. Representação esquemática da localização dos três pares de *primers*, da técnica LAMP, na sequência nucleotídica do gene *flaB* da espécie *B. lusitaniae*, cada par de *primers*, FIP (F1c-F2) e BIP (B2-B1c); F3 e B3; LF e LB apresenta a mesma cor e as sequências complementares do DNA alvo apresentam-se a vermelho. *Fonte:* Esquema da autora.

2.1.3 - Otimização das condições de amplificação

Diversas condições de reação no que respeita às concentrações de reagentes e de temperatura, foram otimizadas para se obter os melhores resultados. Assim, foram testadas diferentes concentrações dos *primers* FIP/BIP, de betaína, de MgSO₄ e de polimerase *Bst*, bem como diferentes temperaturas e tempos de amplificação (Tabela 4).

Tabela 4. Condições de reação e variações testadas na técnica LAMP.

Concentração dos <i>primers</i>	1,6µM
FIP/BIP	0,8 µM
Concentração de Betaína	0,8M 1M
Concentração da enzima <i>Bst</i>	2U; 4U; 8U
Concentração de MgSO₄	2mM 8mM 10mM
Temperatura	66, 67, 68, 69°C Touchdown 72, 70, 68°C
Tempos de reação	60 minutos 45 minutos
Utilização ou não de <i>loop primers</i>	

2.1.4 - Visualização dos produtos de amplificação

A observação dos resultados obtidos pela técnica LAMP foi efetuada de três formas: *i*) Por observação da turvação a olho nu; *ii*) Por adição de 1µl de SYBR® *Green I* 10 000x (Invitrogen™), diluído 1:10 em DMSO (Dimetil Sulfoxido - Sigma®); *iii*) Por eletroforese em gel de agarose (Bioline®) a uma concentração de 2,5%. Este foi preparado com 100ml de tampão *Tris Acetate EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)* 1x (TAE), com adição de 2µl de *GreenSafe Premium* (NZYTech). Para cada poço no gel, foram pipetados 2µl de cada produto de amplificação com 1µl de *Loading Buffer*, seguindo-se a eletroforese a 120V durante 50 minutos. Posteriormente o gel foi observado e fotografado sob luz ultravioleta (UV) no equipamento “Dolphin-Doc Plus Gel Image system” (Wealtec®).

2.1.5 - Sondas para identificação do DNA borreliano amplificado

Numa pesquisa bibliográfica percebeu-se que, segundo Mori e colaboradores em 2006, a técnica LAMP multiplex poderia ser associada a sondas marcadas com diferentes fluorocromos tendo como alvo a sequência dos *primers loop*. Permitindo efetuar a identificação da espécie que foi amplificada pela observação da cor a olho nu. Para tal, a seguir à reação de amplificação, seria adicionado um polímero, o *Polyethylenimine* (PEI), cuja função é ligar-se a moléculas com carga negativa, como é o caso do DNA, tornando-as pesadas e originando após centrifugação, um sedimento da cor do fluorocromo da sonda que se ligou aos produtos da amplificação (41).

De modo a prevenir uma possível ausência de especificidade de espécie dos *primers* da reação LAMP, com base no trabalho anteriormente referido, foram desenhadas sondas para a zona com maior heterologia do gene *flaB* de duas das espécie de *Borrelia* em estudo, *B. lusitaniae* e *B. afzelii* marcadas com os fluorocromos ROX e FITC na extremidade 3' (Tabela 5), não permitindo a ocorrência de uma extensão a partir deste, originando falsos positivos (41).

Tabela 5. Sequência das sondas marcadas com fluorocromo para *B. lusitaniae* e *B. garinii*.

Sonda	Sequência 5' – 3'	Marcação	Tm
<i>B. lusitaniae</i>	TTGAACACCTTCTTGAGCAGGTGCA (25nt)	3' - ROX	63°C
<i>B. garinii</i>	CTTGTTGAGCTCCTTCTTGAACAGG (25nt)	3' - FITC	63°C

As sondas foram adicionadas após a reação de amplificação da técnica LAMP na concentração final de 1pmol em 25µl, segundo o protocolo:

1. Aquecimento a 90°C durante 5 minutos, para abertura das cadeias;
2. Arrefecer a 65°C durante 1 minuto, para a ligação das sondas;
3. Deixar arrefecer e adicionar 1µl de PEI a 20µmol/l;
4. Centrifugar a 4500rpm durante 10seg;
5. Observação à luz U.V.;

As sondas também foram adicionadas à mistura inicial de amplificação.

2.1.6 - Determinação da especificidade

Para determinar a especificidade da técnica LAMP foi necessário dispor de DNA de quatro espécies de *Borrelia*, de outras espiroquetas e de outros microrganismos, tendo-se dado preferência aos que possam estar presentes no vetor. Para a obtenção de DNA das bactérias do género *Borrelia*, a extração foi efetuada a partir de culturas de estirpes de referência representativas de quatro espécies, *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. e *B. lusitaniae* (Tabela 6), mantidas no laboratório do GLBL. Estas apresentavam um crescimento entre 10^7 - 10^8 bactérias/ml, avaliado através do espectrofotómetro “SmartSpec™ Plus” (Biorad®), com leitura da densidade ótica a 600nm. Uma vez que estas apresentam uma membrana rica em lipoproteínas que dificulta a sua lise através de kits comerciais existentes no mercado, utilizou-se um protocolo de extração por hidrólise alcalina com uma solução de amónia, NH₃ – Merck (ver Anexo 1). Este protocolo foi otimizado e está em uso no laboratório do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme (GLBL).

Tabela 6. Descrição da origem e do país de quatro estirpes de referência de espécies do complexo *B.b.s.l.* utilizadas neste trabalho.

Espécies	Estirpes	Origem	País
<i>Borrelia garinii</i>	PBi Japão	LCR humano	Alemanha
<i>Borrelia afzelii</i>	PGau	Pele humana	Alemanha
<i>Borrelia lusitaniae</i>	PoHL1	<i>Ixodes ricinus</i> Pele humana	Portugal
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	B31	<i>Ixodes scapularis</i>	EUA

O DNA de outros microrganismos, tais como o de outras espiroquetas (*Leptospira* e *Treponema*) e protozoários, estes últimos transmitidos por ixodídeos e flebótomos, foram gentilmente cedidos por outros grupos da Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Microbiologia Médica e da UEI de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, nomeadamente:

- *Leptospira interrogans* (Serovar Icterohaemorrhagiae).
- *Treponema pallidum*;
- *Theileria* sp;
- *Babesia* sp;

- *Leishmania infantum*;

2.2 - Determinação da sensibilidade das técnicas moleculares

O DNA obtido das quatro estirpes de referência representativas das quatro espécies de *Borrelia* utilizadas neste trabalho, teve três “origens” distintas:

1. DNA extraído de diluições seriadas de culturas (10^6 , 10^3 e 10^{-1} bactérias/ml) efetuadas a partir de uma cultura “Mãe” com crescimento 10^7 bactérias/ml, leitura realizada no espectrofotômetro a 600nm, tendo o DNA sido obtido por três métodos distintos: *i*) Extração por hidrólise alcalina (ver anexo 1); *ii*) Fervura - obtenção do sedimento de uma cultura após centrifugação, sendo este ressuscitado em água destilada estéril e aquecido durante 10 minutos a 96°C ; e *iii*) Extração com kit comercial (Citomed) segundo as indicações do fabricante; para verificar a eficiência de cada extração;
2. DNA conservado a -20°C , e extraído por hidrólise alcalina (ver anexo 1), a partir do qual se efetuaram diluições de 100ng/ μl a 10fg/ μl ;
3. DNA extraído por hidrólise alcalina (ver anexo 1) de culturas com crescimento 10^7 e 10^8 bactérias/ml, a partir do qual se efetuaram diluições de 5ng/ μl a 0,5fg/ μl .

A concentração das extrações obtidas nos pontos 2 e 3, foram determinadas no “NanoDrop 1000 spectrophotometer” (ThermoFisher Scientific) em ng/ μl e ajustadas para concentrações de 100ng/ μl e de 5ng/ μl . A partir destas concentrações, foram efetuadas diluições seriadas de 1:10 até 1 e 0,5fg/ μl , respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Concentrações iniciais de DNA obtido e diluições seriadas de 1:10.

Concentração de DNA inicial	Diluições seriadas 1:10
100ng/ μl	10ng/ μl , 1ng/ μl , 100pg/ μl , 10pg/ μl , 1 pg/ μl , 100fg/ μl , 10fg/ μl
5ng/ μl	0,5ng/ μl , 50pg/ μl , 5pg/ μl , 0,5pg/ μl , 50fg/ μl , 5fg/ μl

2.3 - *Nested-PCR* para o complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*

2.3.1 - *Nested-PCR* - Espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rri*) do rDNA

A organização dos genes do rRNA das espécies de *Borrelia* associadas à borreliose de Lyme é única entre as bactérias. Nestes apenas existe um gene *rrs* (16S) e duas cópias do cada gene *rri* (23S) e *rrf* (5S). Esta característica única foi utilizada na amplificação do espaço entre as cópias dos genes *rrf* e *rri* repetidos em tandem, constituindo por isso uma amplificação específica para as bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l.. Na primeira amplificação, os *primers* ligam-se aos genes da subunidade 23S, um à extremidade 3' do gene *rriA* (23S) e o outro à extremidade 5' do gene *rriB* (23S) na segunda amplificação os *primers* ligam-se ao produto de amplificação resultante da primeira amplificação (26, 42, 43), como representado no esquema da Figura 29.

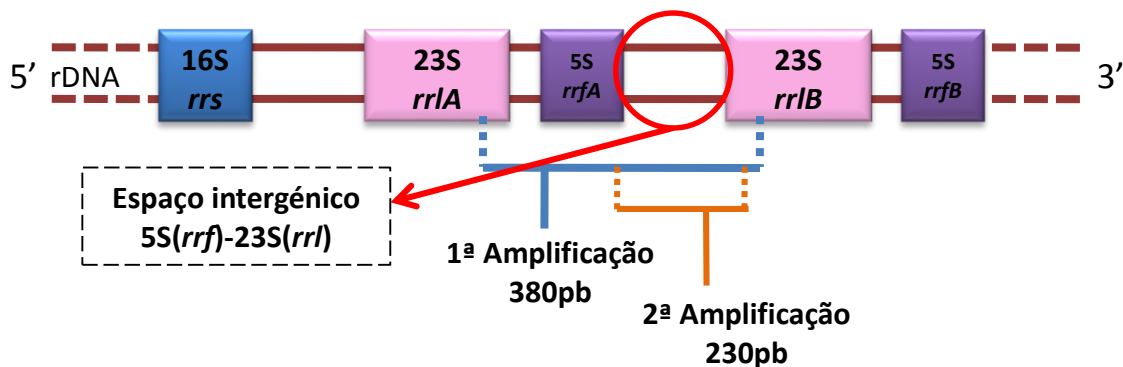


Figura 29. Esquema representativo do rDNA ou gene do rRNA que codifica o ribossoma das espécies de *B.b.s.l.*, com indicação do tamanho dos produtos de amplificação da *nested-PCR* para o espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rri*) (26), a primeira amplificação da sequência nucleotídica entre os dois genes *rri* (23S) com 380pb e a segunda amplificação a partir do produto da primeira amplificação, da zona correspondente ao espaço entre os genes *rrf* (5S) e *rri* (23S) com 230pb. *Fonte:* Esquema da autora.

A sequência nucleotídica dos *primers* para a primeira e segunda reação de PCR estão descritas na Tabela 8 e as condições da reação na Tabela 9.

Tabela 8. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na *nested-PCR* para o espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) do rDNA do complexo *B.b.s.l.* (43).

Designação do <i>primer</i>	Sequência nucleotídica	Posição	Dimensão do Amplicão
23SN1 (1ª PCR)	5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC-3'	469-446	380 pb
23SC1 (1ª PCR)	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	92-115	
23SN2 (2ª PCR)	5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA-3'	469-444	230 pb
5SC2 (2ª PCR)	5'-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3'	243-263	

Tabela 9. Reagentes e condições de reação da *nested-PCR* para espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) do rDNA do complexo *B.b.s.l.* (43).

<i>Nested-PCR</i> 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>) rDNA		
Reagentes para Mix	Concentrações	Volumes
H ₂ O destilada estéril	-----	1ª PCR: 20µl Mix
Buffer (Bioline®)	1x	
MgCl ₂ (Bioline®)	2,5mM	+
dNTP's (Bioline®)	0,8mM	5µl de amostra
1ª PCR, <i>Primers</i> 1 e 2 (23SN1 e 23SC1)	0,2µM	2ª PCR: 20µl Mix
2ª PCR <i>Primers</i> 2 e 4 (23SN2 e 5SC2)	0,2µM	
Taq polimerase	0,6U/µl (Bioline®)	+
		5µl do produto da 1ª PCR
Condições de amplificação 1ª e 2ª PCR		
1 ciclo	1ª PCR - 25 ciclos; 2ª PCR – 40 ciclos	1 ciclo
	Desnaturação – 30s, 94°C	
Desnaturação inicial: 1 min, 94,5°C	Emparelhamento 1ª PCR – 30s, 52°C	Extensão final: 5 min, 72°C
	Emparelhamento 2ª PCR – 30s, 55°C	
	Extensão – 1 min, 72°C	

2.3.2 - *Nested-PCR* para o gene *flaB*

O gene *flaB*, tal como os genes ribossomais, está codificado no único cromossoma de *Borrelia*, ou seja, onde se localizam os genes mais conservados. Os *primers* utilizados foram de acordo com Wodecka e colaboradores, 2010 (25), como representado na Figura 30.

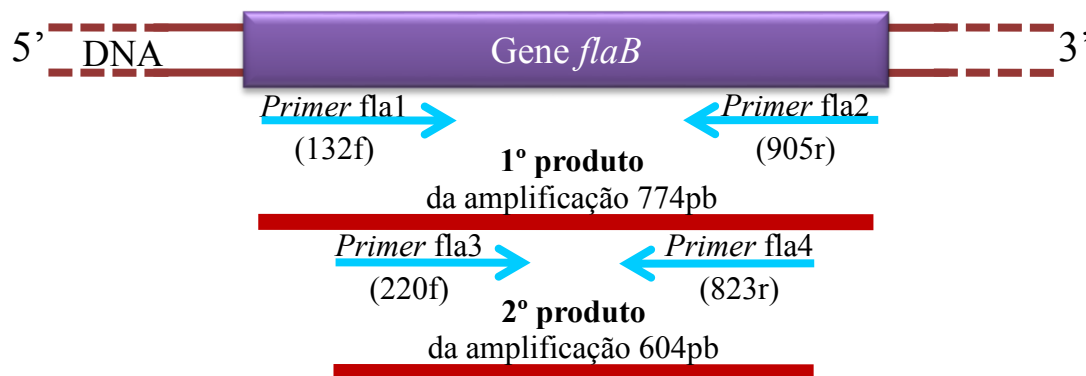


Figura 30. Representação esquemática do local de ligação dos *primers* da *nested-PCR* para o gene *flaB* das espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* (25). *Fonte:* Esquema da autora.

As seqüências nucleotídicas dos *primers* para a primeira e segunda amplificação encontram-se descritas na Tabela 10 e as condições de amplificação na Tabela 11 (25).

Tabela 10. Seqüências nucleotídicas dos *primers* da *nested-PCR* para o gene *flaB* das espiroquetas do complexo *B.b.s.l.* (25).

Designação dos <i>primers</i>	Seqüência nucleotídica	Dimensão do Amplicão
Fla1 (132f) - 1ª PCR	5'-TGGTATGGGAGTTTCTGG-3'	774 pb
Fla2 (905r) - 1ª PCR	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	
Fla3 (220f) - 2ª PCR	5'-CAGACAACAGAGGGAAAT-3'	604 pb
Fla4 (823r) - 2ª PCR	5'-TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC-3'	

Tabela 11. Reagentes e condições de reação da *nested*-PCR para o gene *flaB* do complexo *B.b.s.l.* (25).

<i>Nested</i> -PCR <i>flaB</i>		
Reagentes para Mix	Concentrações no tubo	Volumes
H ₂ O destilada estéril	-----	
Buffer (Bioline®)	1x	1ª PCR: 22,5µl de Mix 1
MgCl ₂ (Bioline®)	1,5mM	+
dNTP's (Bioline®)	1mM	2,5µl de amostra
1ª PCR <i>Primer Fla1 e 2</i>	1µM	2ª PCR:
2ª PCR <i>Primer Fla3 e 4</i>	1µM	24µl de Mix
<i>Taq</i> polimerase (Bioline®)	1U/µl	+
		1µl do produto da 1ª PCR
Condições de amplificação 1ª e 2ª PCR		
1 ciclo	40 ciclos	1 ciclo
Desnaturação inicial: 10 min, 94°C	Desnaturação – 30s, 94°C Emparelhamento 1ª PCR – 45s, 50°C Emparelhamento 2ª PCR – 45s, 54°C Extensão – 1 min, 72°C	Extensão final: 7 min, 72°C

Ambas as reações de *nested*-PCR e a técnica LAMP, foram realizadas no termociclador “MyCycler™ Thermal Cycler” (BioRad®).

2.3.3 - Visualização dos resultados de reações de *nested*-PCR

Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de agarose com concentração a 1,5% (Bioline®) preparados em 100ml de tampão TAE, com 2µl de *GreenSafe Premium* (NZYTech). Para cada poço do gel foram pipetados 5µl de cada produto de amplificação com 1µl de *Loading Buffer*, utilizou-se um de marcador molecular de 100pb, *HyperLadder IV* (100-1000 pb) (Bioline®). A eletroforese decorreu a 120V durante 40 minutos, o gel foi observado e fotografado sob luz ultravioleta (UV) no equipamento “Dolphin-Doc Plus Gel Image system” (Wealtec®).

2.4 - PCR em tempo real (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real, tem por base a tecnologia *Taqman*® permitindo a deteção e quantificação de DNA das espécies do complexo *B.b.s.l.* No presente trabalho o alvo

molecular foi o gene *flaB*, tendo a técnica sido previamente otimizada pelo GLBL (Tabela 12).

Tabela 12. Primers, sondas, reagentes e condições de reação da técnica de qPCR para o complexo *B.b.s.l.*, desenhados e otimizados pelo GLBL.

qPCR Género			
Designação	Sequência	T _m	Fluoróforo
<i>Primer Forward</i>	5' – TTAATGTTACAACYACAGTTGA – 3' Y = C/T	51°C	-----
<i>Primer Reverse</i>	5' – ACCTCATCTGTCATTGTAGC – 3'	55°C	-----
<i>Sonda B.b.s.l.</i>	5' – TTGGAAAGCACCTAAATTTGCTCTT- 3'	58°C	JOE

Reagentes	Concentrações na reação	Volume por tubo (20µl)
<i>Master mix, 2x (Bioline)</i>	1x	
<i>Primer forward, 6µM (MWG)</i>	0,3µM	18µl Mix
<i>Primer reverse, 6µM (MWG)</i>	0,3µM	+
<i>Sonda TaqMan, 5µM (MWG)</i>	0,25µM	2µl DNA
H ₂ O destilada estéril	-----	

Condições de amplificação	
1 Ciclo	40 ciclos
Desnaturação inicial – 1 min, 95°C	Desnaturação – 10s, 95°C Emparelhamento – 45s, 60°C

As amplificações foram efetuadas no termociclador “7500 Fast Real-Time PCR System” da *Applied Biosystems*, (Figura 31).



Figura 31. Termociclador “7500 Fast Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*). Fonte: Fotografia da autora.

Esta técnica utiliza controlos internos, permitindo controlar as condições de amplificação e a existência de DNA da amostra, neste caso de amostras humanas e de ixodídeos. Para o DNA proveniente de amostras biológicas de soro e LCR utilizaram-se *primers* para o gene da β -actina (44), Tabela 13.

Tabela 13. Sequências nucleotídicas dos *primers* e sonda para o gene da β -actina para a qPCR, utilizados como controlos internos, em amostras biológicas humanas de soro e LCR (44).

qPCR β -actina			
Designação	Sequência	Tm	Fluróforo
<i>Primer forward</i>	5' – GGCTCYATYCTGGCCTC – 3' (Y=C/T)	59,6°C	-----
<i>Primer reverse</i>	5' – GCAYYTTGCGGTGSACRATG – 3' Y = C/T; S = G/C; R = G/A	59,5°C	-----
Sonda	5' – TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC – 3'	65,2°C	FAM

Para as amostras de ixodídeos utilizou-se um conjunto de *primers* para o gene 18S de rRNA, previamente desenhados pelo GLBL, Tabela 14.

Tabela 14. Sequências nucleotídicas dos *primers* e sondas para o gene 18S do rRNA para a qPCR, utilizados como controlos internos em amostras de ixodídeos.

qPCR 18S			
Designação	Sequência	Tm	Fluróforo
<i>Primer forward</i>	5' – AGCTAATACATGCAGTGAGC – 3'	56,4°C	-----
<i>Primer reverse</i>	5' – CTCGTGGCCATGCGATCA – 3'	58,4°C	-----
Sonda	5' – ATCTTGGTCTAATAAAAGCACCCG – 3'	61,8°C	FAM

Foram efetuadas as curvas de calibração para cada um dos alvos em estudo - β -actina, 18S e complexo *B.b.s.l.*, a curva de calibração para o complexo *B.b.s.l.* foi realizada com uma mistura de DNA's das seis espécies disponíveis no laboratório do GLBL (*Borrelia burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* e *B. bavariensis*) a uma concentração inicial de 5ng/ μ l, a partir da qual se efetuaram diluições seriadas de 1:10 até às 5fg/ μ l. Para a β -actina e gene 18S efetuaram-se as mesmas diluições de 5ng/ μ l a 5fg/ μ l, utilizando-se DNA de amostras de soro de população saudável e DNA de ixodídeos respetivamente (Figura 32).



Figura 32. Representação das diluições de 5ng a 5fg de DNA de *Borrelia*, ixodídeos e amostras biológicas humanas. Fonte: Fotografia da autora:

- 1- DNA de seis espécies de *Borrelia*;
- 2- DNA de amostras de ixodídeos;
- 3- DNA de amostras biológicas humanas, extraído a partir de soros.

2.5 - Determinação da exatidão (acurácia) da técnica LAMP

2.5.1 - Amostras de Ixodídeos e amostras humanas (soro e LCR)

As amostras humanas (soro e LCR) foram provenientes da seroteca do GLBL correspondentes aos anos de 2010 a 2014, totalizando 22 amostras. Foram selecionadas aleatoriamente duas a três amostras de cada ano, testadas pela técnica de *nested*-PCR para o espaço intergênico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) de *B.b.s.l.*, totalizando, nove amostras com resultado positivo (sete LCR e dois soros) e 13 amostras com resultado negativo (oito LCR e cinco soros). O DNA destas amostras, foi extraído pelo kit comercial *Citogene*[®] *Cell & Tissue KIT* (Citomed) de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido efetuados controlos de extração.

As amostras de ixodídeos foram selecionadas a partir de uma coleção de extratos de DNA existente no laboratório do GLBL, tendo sido selecionadas cerca de 10 amostras que obedeciam a cada um dos seguintes critérios: *i*) Resultado positivo nas duas *nested*-PCR; *ii*) Resultado positivo numa das *nested*-PCR e *iii*) Amostras negativas escolhidas aleatoriamente, totalizando 37 amostras como descrito na Tabela 15.

Tabela 15. Total de amostras de ixodídeos selecionados de acordo com os resultados obtidos nas duas técnicas de *nested*-PCR.

<i>Nested</i> -PCR		Nº Ixodídeos
5S(<i>rrl</i>)-23S(<i>rrf</i>)	<i>flaB</i>	
Positivo	Positivo	6
Positivo	Negativo	13
Negativo	Positivo	8
Negativo	Negativo	10
Total		37

A extração do DNA dos ixodídeos foi efetuada por hidrólise alcalina a partir de *pools* com larvas e ninfas (10 larvas e 5 ninfas) e individualmente nos adultos. As carraças foram colocadas num tubo *Eppendorf*[®] *safe-lock* de 1,5 ml contendo solução extemporânea de amónia a 20% e maceradas manualmente. Os tubos fechados foram colocados num termobloco a 100°C durante 20 minutos, após o que foram abertos até evaporar metade do volume inicial. Estes produtos de extração foram devidamente conservados a -20°C (47), sendo posteriormente analisados pelos dois protocolos de *nested*-PCR previamente descritos (ponto 2.3).

2.5.2 - Método para a determinação da exatidão

A exatidão (ou acurácia) é a avaliação de desempenho de um novo teste molecular, isto é, quando se pretende avaliar se este é capaz de detetar se um determinado agente causal da doença/problema está verdadeiramente presente ou ausente na amostra. Inclui o cálculo da especificidade e da sensibilidade, fazendo-se a comparação dos resultados obtidos com o método experimental com os resultados obtidos com o método considerado “*Gold standard*”. Assim, quanto maiores forem esses valores mais robustos são os resultados obtidos, (45, 46) (Quadro 2).

No presente trabalho o método experimental é a técnica LAMP, relativamente ao método *Gold standard*, deveria ser a cultura, no entanto, devido ao tipo de amostras utilizadas que já não dispõem de espiroquetas viáveis, a comparação foi efetuada com dois protocolos moleculares em uso no laboratório do GLBL, duas técnicas de *nested*-PCR para o gene *flaB*

e espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) (consideradas *Gold standard* na área de diagnóstico da BL) e a PCR em tempo real para o gene *flaB* atualmente em otimização no referido laboratório. Estas técnicas estão descritas no ponto 2.3 e 2.4 do presente trabalho.

Quadro 2. Representação da forma de cálculo do valor da exatidão de um método experimental efetuando a comparação com o método *Gold standard*, para obtenção do número de verdadeiramente positivos e negativos e falsos positivos e negativos (45).

Resultado obtidos com o método <i>Gold standard</i>	Resultados obtidos com o método experimental	
		POSITIVOS
POSITIVOS	Verdadeiros Positivos (VP)	Falsos Negativos (FN)
NEGATIVOS	Falsos positivos (FP)	Verdadeiros Negativos (VN)

Relativamente à sensibilidade, esta é definida pela proporção de amostras em que foi **detetada** a presença de DNA borreliano com o método experimental, neste trabalho a técnica LAMP, face às amostras que têm um resultado positivo com as técnicas consideradas como *Gold standard*, mostrando a eficácia do método a identificar as amostras com DNA de *Borrelia*. Assim, para calcular a sensibilidade do novo método aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Sensibilidade (S)} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

A especificidade aplicada à técnica LAMP, é a proporção de amostras onde esta técnica não detetou DNA borreliano face ao número de amostras onde esse DNA **não foi detetado** pelo método *Gold standard*, o que indica a eficácia do método para identificar as amostras sem o referido DNA. Assim, para calcular a especificidade do novo método aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Especificidade (E)} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

3 - RESULTADOS

Nesta secção serão apresentados os resultados que foram sendo obtidos na sequência das modificações efetuadas nas diferentes variáveis da técnica LAMP, como referido em Material e Métodos, até à otimização final da técnica e à aplicação da mesma a vetores (carrças) e a amostras humanas de doentes com suspeita de BL, para deteção de *Borrelia* spp.

3.1 - Otimização da técnica LAMP vs diferentes parâmetros

3.1.1 - Proporção de primers

Um dos parâmetros que foi considerado na presente otimização teve a ver com proporção de primers FIP e BIP em relação aos primers F3 e B3, uma vez que diversos autores descrevem a utilização de uma concentração de primers FIP e BIP quatro vezes maior comparativamente aos primers F3 e B3, enquanto outros autores descrevem uma concentração oito vezes superior. Por esta razão foram testadas duas concentrações de primers FIP e BIP de 1,6µM e 0,8µM mantendo a dos primers F3 e B3 a 0,2µM. Assim, num primeiro ensaio foram utilizados os conjuntos de primers de cada uma das quatro espécies de *B.b.s.l.*, após o qual se passou a utilizar apenas o conjunto de primers para a espécie *B. lusitaniae* na otimização das restantes condições. Foi utilizado DNA extraído a partir das culturas de *Borrelia*, pelo kit comercial *Citogene® Cell & Tissue KIT* (Citomed) (C) e por hidrólise alcalina (A), como documentado na Figura 33.

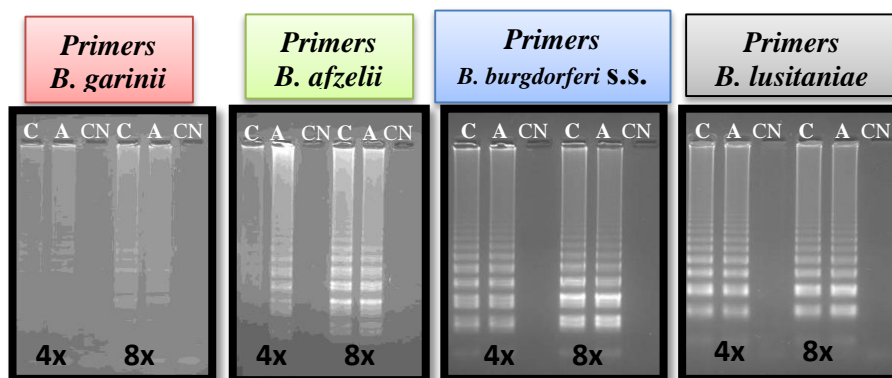


Figura 33. Diferentes proporções de primers, FIP/BIP vs F3/B3 na reação de LAMP, testadas com os conjuntos de primers para o gene *flaB* de quatro espécies de *Borrelia* do complexo *B.b.s.l.*. Primers FIP e BIP na concentração 1,6µM (8x) e 0,8µM (4x) em relação ao F3 e B3 com 0,2µM, com DNA da respetiva espécie, C - DNA obtido com kit comercial; A - DNA obtido por hidrólise alcalina; CN - Controlo Negativo.

Verificou-se que o método de extração não teve influência nos produtos amplificados (apesar de se verificar uma visualização mais intensa das bandas com hidrólise alcalina na espécie *B. afzelii*). Relativamente à proporção de *primers* utilizados, globalmente obteve-se uma maior intensidade de bandas com os *primers* FIP e BIP, correspondentes à proporção oito vezes superior, ou seja, na concentração de 1,6 μ M, concentração com a qual se passou a trabalhar nos ensaios subsequentes.

3.1.2 - Utilização de *primers loop*

Alguns autores descrevem a técnica LAMP sem a utilização de *primers loop*. Assim, para verificar se estes seriam essenciais ou não na reação de amplificação, efetuaram-se duas reações de LAMP com e sem os *primers loop*, tendo-se verificado que a utilização destes *primers* é essencial na reação de amplificação, como se demonstra na Figura 34.

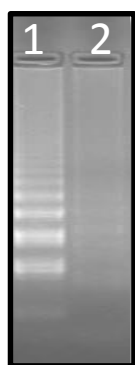


Figura 34. Reação de LAMP com e sem *primers loop*
1 - Com *primers loop*;
2 - Sem *primers loop*;

3.1.3 - Concentração da DNA polimerase - *Bst*

Foram testadas as concentrações de 2U, 4U e 8U da enzima *Bst*. Os resultados obtidos permitiram verificar que a concentração de 8U teve um melhor desempenho na reação de amplificação, tendo-se observado uma maior quantidade do produto de amplificação (Figura 35).

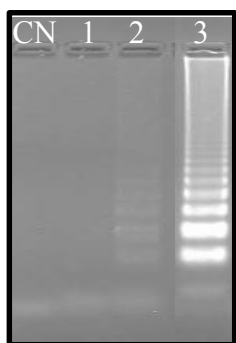


Figura 35. Diferentes concentrações de enzima *Bst*:
CN – Controlo Negativo
1 – 2U de *Bst*;
2 – 4U de *Bst*;
3 – 8U de *Bst*.

3.1.4 - Temperatura e concentração de betaína

Com o objetivo de se tentar aumentar a sensibilidade da técnica e eliminar possíveis amplificações inespecíficas conjugou-se o método de *touchdown* à técnica LAMP. Este método utiliza uma temperatura da reação acima da temperatura de ligação dos *primers*, sendo que esta vai depois diminuindo progressivamente de dois em dois graus até ser atingida a temperatura ideal de ligação destes. A Figura 36, mostra o resultado obtido na reação LAMP com DNA de diluições seriadas de *B. lusitaniae* com temperaturas de *touchdown*.

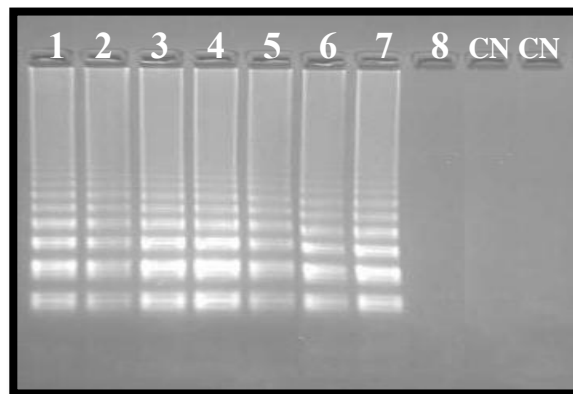


Figura 36. Reação de LAMP com DNA de *B. lusitaniae* e temperaturas de *touchdown*, 74,72,70,68°C, poços de 1 a 8 com diluições seriadas, 5 e 0,5ng/μl, 50, 5, 2.5, 1 e 0.5pg/μl, e 50fg/μl, o poço 7 demonstra um limite de detecção de **0.5pg/μl**; CN - Controlo Negativo.

Apesar dos bons resultados obtidos com o *touchdown* LAMP, este protocolo não foi assumido pois o objetivo inicial de desenvolver uma técnica molecular rápida, utilizando apenas um banho-maria, ficaria em causa. Assim, testou-se a reação de LAMP mantendo a concentração da betaína a 1M mas variando a temperatura (Figura 37).

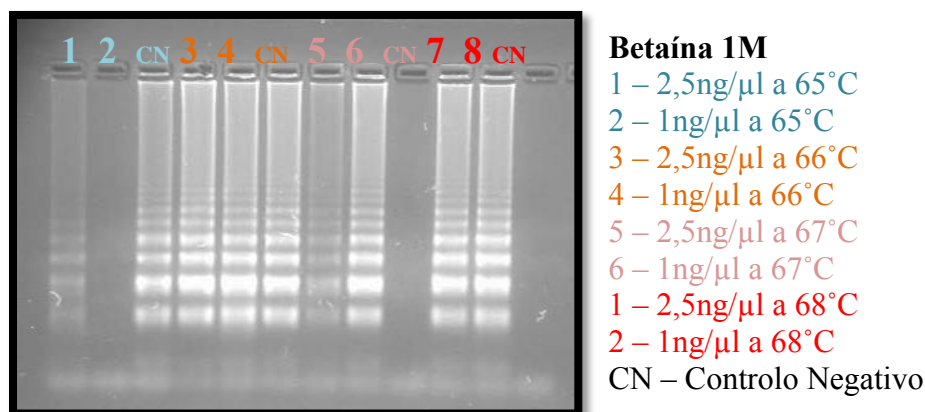


Figura 37. Reação de LAMP com variação da temperatura mantendo a concentração da Betaína a 1M.

Verificou-se que nas temperaturas mais elevadas não se obtinham ampliações inespecíficas nos controlos negativos. Assim, foi assumida a temperatura de 68°C, tendo-se seguidamente efetuado uma reação LAMP apenas com as diluições na ordem dos picogramas de DNA de *B. lusitaniae*, como representado na Figura 38. Observou-se uma evidente perda de sensibilidade, com 2,5pg/μl, relativamente ao *Touchdown* com 0,5pg/μl.

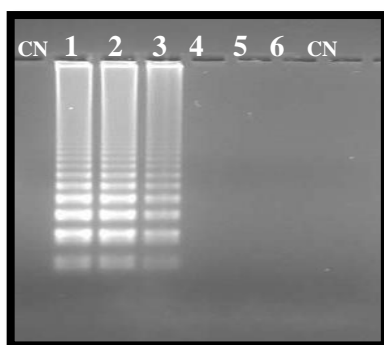


Figura 38. Reação de LAMP a 68°C com betaína 1M para a espécie *B. lusitaniae*, poços de 1 a 6 com diluições seriadas, de 50, 5, 2.5, 1, 0.5 e 0.1pg/μl, o poço 3 demonstra um limite de deteção de 2.5pg/μl.

3.1.5 - Tempo de amplificação

Relativamente ao tempo de reação, as primeiras reações de amplificação decorreram durante 60 minutos. Pretendeu-se, no entanto saber se diminuindo esse tempo se obtinham os mesmos resultados. Para o efeito utilizaram-se quatro diluições de DNA de *B.b.s.s.* e efetuaram-se duas reações, uma durante 60 minutos (Figura 39-A), e outra, durante 45 minutos (Figura 39-B). Os resultados obtidos mostraram que a variável “tempo” não influenciou a amplificação pelo que se passou a utilizar os 45 minutos.

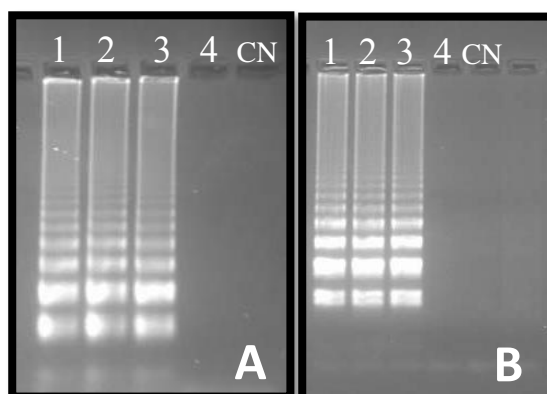


Figura 39. Reação de LAMP com diferentes tempos de amplificação, testados com 4 diluições de DNA de *B.b.s.s.* de 5, 2.5, 1 e 0.5 ng/μl, **A)** Reação durante 60 minutos; **B)** Reação durante 45 minutos.

3.1.6 - Concentração de MgSO₄ vs a temperatura

As diversas amplificações de DNA de *B.b.s.l.* com a técnica LAMP, foram sempre executadas com uma concentração de 8mM de MgSO₄. Num dos ensaios, incrementou-se a concentração de MgSO₄ para 10mM, tendo-se verificado a inibição da reação de amplificação (resultados não mostrados). Como é amplamente reconhecido os iões de Mg estabilizam a força da ligação entre as cadeias de DNA, assim, com o objetivo de diminuir as amplificações inespecíficas, diminuiu-se a sua concentração. Deste modo a reação LAMP foi testada a 65°C e 68°C para as quatro espécies de *Borrelia* com a concentração *standard* (2mM) de MgSO₄ existente no tampão que acompanha a enzima, a Figura 40 apenas documenta os resultados obtidos com DNA da espécie *B. lusitaniae*. Constatou-se que a 65°C, a reação mostrou uma sensibilidade de 5pg/μl, enquanto que a 68°C a sensibilidade se perde, ficando apenas pelos 50pg/μl.

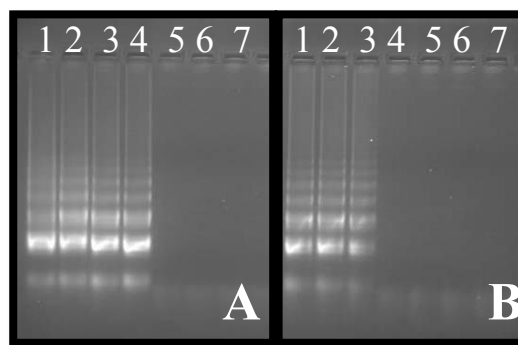


Figura 40. Reação de LAMP com MgSO₄ 2mM e DNA da espécie *B. lusitaniae* a diferentes temperaturas. Poços 1 a 7 – 5 e 0,5 ng/μl, 50; 5 e 0,5pg/μl, 50 e 5fg/μl de DNA de cada espécie. **A)** Reação a 65°C; **B)** Reação a 68°C.

Concluiu-se que a uma concentração mais baixa de MgSO₄ se observa uma perda de sensibilidade com o aumento da temperatura, ou seja, para se obter uma maior sensibilidade a uma temperatura mais elevada a concentração de MgSO₄ também deve ser mais elevada. Uma vez que se obteve um limite de deteção mais baixo a 68°C com o MgSO₄ na concentração de 8mM, manteve-se esta condição.

3.1.7 - Protocolo final (otimizado) da técnica LAMP

Após os ensaios realizados para os diversos parâmetros, as concentrações ideais de cada reagente apresentam-se na Tabela 16. Inicialmente todos os parâmetros testados foram para misturas de reação com um volume final de 25µl, no entanto, de forma a rentabilizar mais os reagentes, a mistura da reação final foi reduzida para 10µl mantendo-se o volume de DNA.

Tabela 16. Protocolo final (otimizado) da técnica LAMP.

Reagentes	Concentração inicial	Concentração na mistura de reação	Volumes-µl (Mistura de reação 25µl)	Volumes-µl (Mistura de reação 10µl)
Água destilada estéril			0,5	0,2
Tampão isotérmico (BioLabs®)	10x	1x	2,5	1
MgSO ₄ (BioLabs®)	10mM	8mM	1,5	0,6
Betaína (Sigma®)	5M	1M	5	2
dNTP (NZytech)	10mM	0,4mM	1	0,4
FIP (STAB Vida)	10µM	1,6µM	4	1,6
BIP (STAB Vida)	10µM	1,6µM	4	1,6
F3 (STAB Vida)	10µM	0,2µM	0,5	0,2
B3 (STAB Vida)	10µM	0,2µM	0,5	0,2
LF (STAB Vida)	10µM	0,4µM	1	0,4
LB (STAB Vida)	10µM	0,4µM	1	0,4
<i>Bst</i> 2,0 WarmStart™ (Biolabs®)	8000U/ml	8U	1	0,4
Amostra/DNA			2,5	1
Condições de amplificação				
68°C, 45 minutos				
80°C, 5 minutos				

3.1.8 - Visualização dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação da técnica LAMP foram visualizados por três métodos: *i)* Observação a olho nu da turvação; *ii)* Observação da cor após adição de *SYBR[®] Green I* e *iii)* Pelo perfil de bandas evidenciado após eletroforese.

Na observação a olho nu, verificou-se a existência ou não de turvação, devendo-se esta à presença de uma grande concentração de íons de pirofosfato de magnésio, resultantes da adição de nucleótidos pela enzima polimerase à cadeia que está a ser polimerizada no decorrer da amplificação, como se documenta na Figura 41.

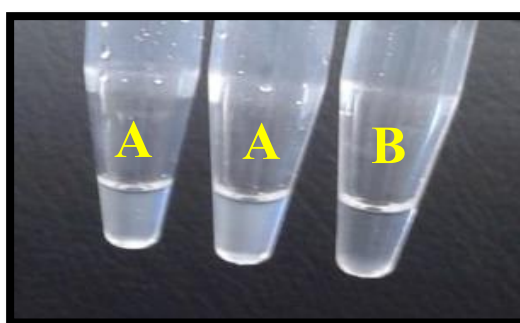


Figura 41. Visualização a olho nu dos produtos de amplificação resultantes da técnica LAMP, A) Presença de turvação resultante da formação de íons de pirofosfato de magnésio – amostras positivas; B) Ausência de turvação – amostra negativa.

No que diz respeito à visualização do resultado da reação de amplificação pela cor, esta ocorreu após adição de 1 µl de *SYBR[®] Green I* em cada tubo de reação, no caso das amostras positivas, este intercala-se nas cadeias duplas de DNA emitindo a cor verde, no caso de amostras negativas permanece com a cor laranja. Esta observação também pode ser efetuada sob luz ultravioleta onde as amostras negativas não emitem luz (Figura 42).

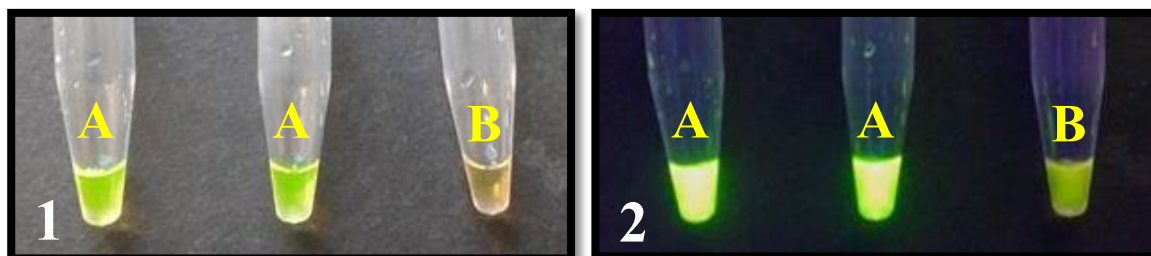


Figura 42. Visualização a olho nu (1) e com luz ultravioleta (2) dos produtos de amplificação da técnica LAMP pela adição de *SybrGreen*: A) Amostras positivas emitindo cor verde; B) Controlo negativo de cor laranja a olho nu e sem emitir fluorescência com luz ultravioleta.

3.1.9 - Determinação da especificidade da técnica LAMP

Após a otimização das condições de amplificação para o conjunto de *primers* de *B. lusitaniae*, aplicaram-se as mesmas condições para os restantes conjuntos de *primers* de forma a determinar a especificidade de cada um, como representado na Figura 43.

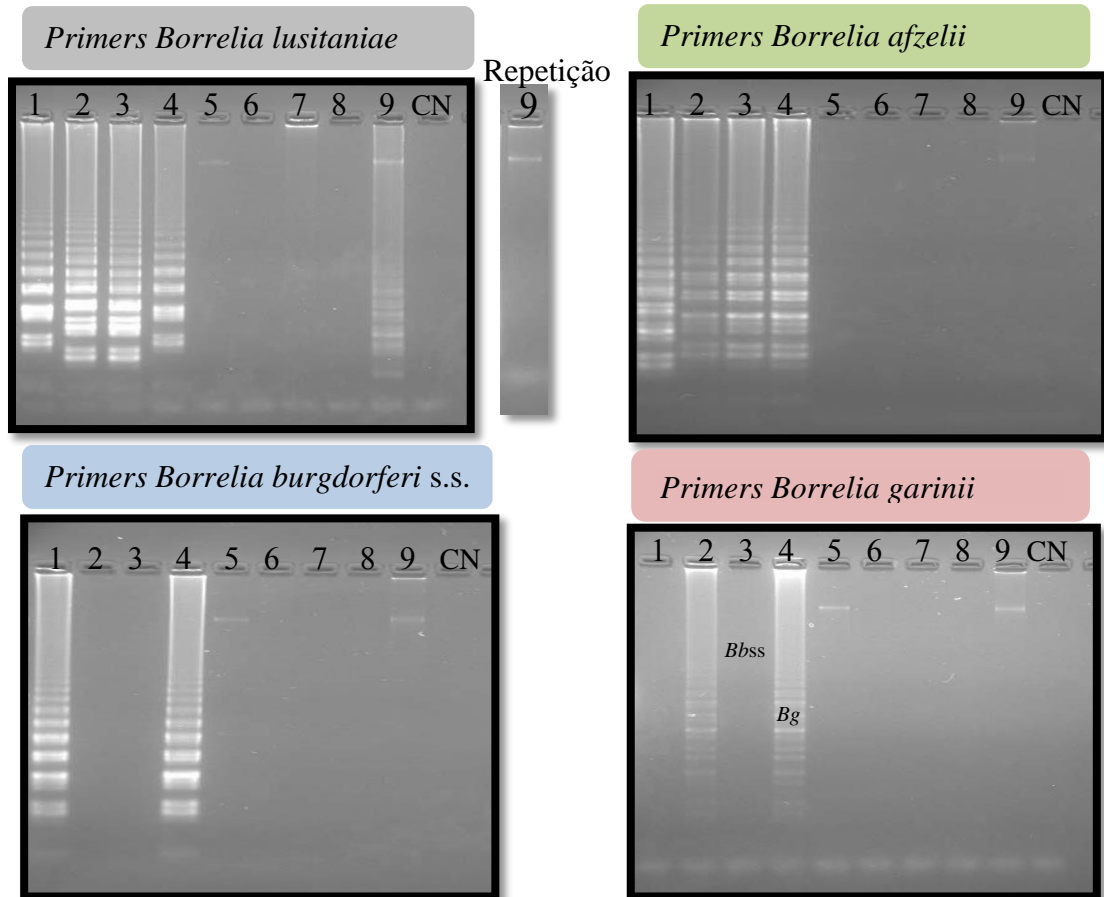


Figura 43. Resultados da especificidade das reações de LAMP com os conjuntos de primers de quatro espécies do complexo *B.b.s.l.*, com DNA dos seguintes

- | | |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 – <i>B. lusitaniae</i> (IH, 96,1 ng/μl); | 6 – <i>Babesia sp.</i> ; |
| 2 – <i>B. afzelii</i> (Pgau, 57 ng/μl); | 7 – <i>Leishmania infantum</i> ; |
| 3 – <i>B. garinii</i> (Pbi, 45,1 ng/μl); | 8 – <i>Treponema pallidum</i> ; |
| 4 – <i>B. burgdorferi</i> s.s. (B31, 89,3ng/μl); | 9 – <i>Leptospira interrogans</i> (M 20); |
| 5 – <i>Theileria sp.</i> | |

Verificou-se que existe especificidade para o complexo *B.b.s.l.*, mas não existe especificidade de espécie, ou seja, cada conjunto de *primers* deveria apenas amplificar a espécie para a qual foi desenhado o que não se verificou. Os conjuntos de *primers* para as espécies *B. garinii* e *B. burgdorferi* s.s. amplificam a própria espécie e uma das outras

espécies *B. afzelii* e *B. lusitaniae* respetivamente e os conjuntos de *primers* para *B. lusitaniae* e *B. afzelii* amplificam as quatro espécies.

Assim, de forma a tentar cumprir o objetivo de distinguir molecularmente com a técnica LAMP, as quatro espécies mais prevalentes de borrelíias na Europa, colocou-se a hipótese de se conseguir essa identificação através de sondas marcadas com fluorocromos e manter a simplicidade da técnica.

3.1.10 - Utilização de sondas para identificação do DNA borreliano

Primeiramente testou-se a concentração do PEI a 20µmol/l, concentração superior à utilizada pelos autores, Mori *et al.*, 2006 (41), adicionando-o a tubos de reação em que ocorreu amplificação, de modo a permitir visualizar o sedimento após centrifugação (Figura 44).

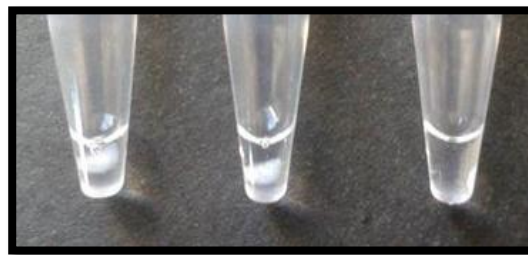


Figura 44. Visualização do sedimento após adição do PEI aos tubos de reação de LAMP, nos dois primeiros tubos houve amplificação e visualiza-se um sedimento branco resultante da ligação do PEI às cadeias de DNA formadas, o último tubo é um controlo negativo.

Após o desenho dos *primers* para as quatro espécies de *Borrelia* verificou-se que os *primers* *loop* não eram específicos de espécie, logo, não poderiam ser utilizados como alvo das sondas. Para testar a reação LAMP com as sondas para outra zona do gene como descrito no ponto 2.1.5 deste trabalho, utilizaram-se duas séries de tubos, uma com DNA e a sonda para a espécie *B. lusitaniae* e outra com DNA e a sonda para a espécie *B. garinii* e um controlo negativo. Após a reação de amplificação, foi adicionado o PEI, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 45.

Nesta abordagem, o objetivo seria obter um sedimento com a cor vermelha ou verde, correspondendo respetivamente à amplificação das espécies *B. lusitaniae* e *B. garinii*, permanecendo branco quando ocorria a amplificação de outras espécies. No entanto,

observou-se que os sedimentos dos tubos ficaram da cor do fluorocromo que está a marcar a sonda, independentemente da presença de DNA correspondente à espécie da sonda.

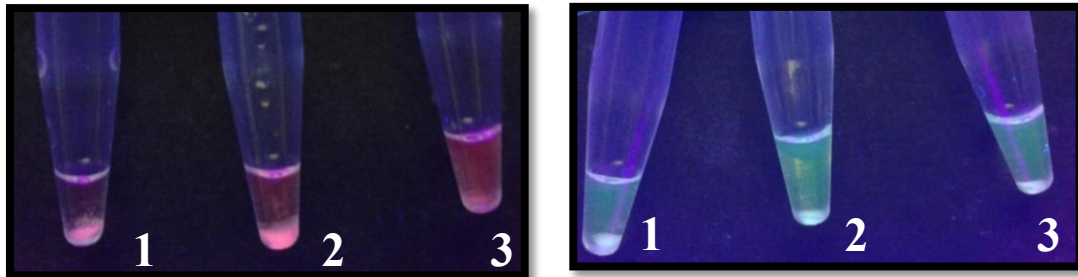


Figura 45. Tubos de reação da técnica LAMP, com adição de sondas e PEI, do lado esquerdo com sonda para *B. lusitaniae* marcada com ROX (vermelho) e do lado direito com sonda para *B. garinii* marcada com FITC (verde).

- 1 - 50ng/ μ l de DNA de *B.lusitaniae*;
- 2 - 50ng/ μ l de DNA de *B.garinii*;
- 3 - Controlo negativo;

Face a estes resultados, esta abordagem foi abandonada.

3.2 - Sensibilidade das técnicas moleculares

Para determinar a sensibilidade da técnica LAMP, utilizaram-se os *primers* desenhados para a *B. lusitaniae*, uma vez que estes amplificam as quatro espécies.

1 - DNA extraído de diluições seriadas de culturas de *B.b.s.l.*

Na técnica LAMP, apenas se verificou a amplificação de DNA resultante da extração de uma cultura de *B.b.s.l.* com um crescimento de 10^6 bactérias/ml nas quatro espécies de *Borrelia*, como representado na Figura 46A. Na *nested*-PCR para o espaço intergénico obteve-se o mesmo resultado com exceção de *B. afzelii* em que também se observou amplificação de DNA resultante da extração da cultura com uma concentração de 10^3 bactérias/ml e apenas por hidrólise alcalina (Figura 46B).

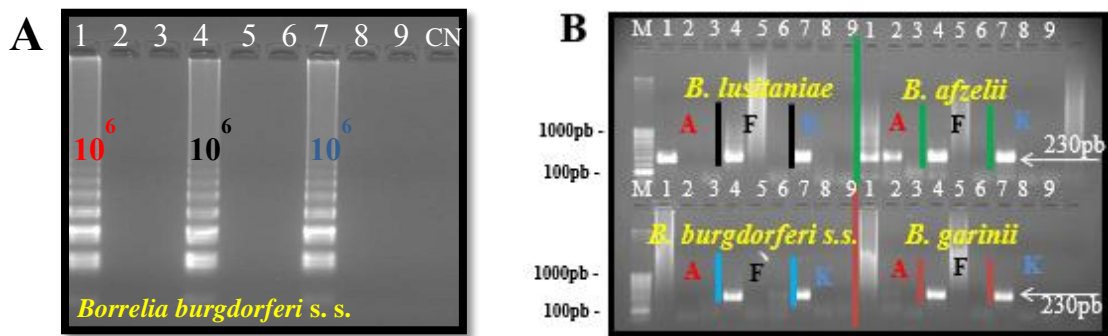


Figura 46. Resultados com DNA de culturas de espécies de *Borrelia* do complexo *B.b.s.l.* em diluições seriadas de 10^6 , 10^3 e 10^{-1} bactérias/ml com o protocolo da amónia (A) poços 1, 2, 3, fervura (F) poços 4, 5, 6 e kit da Citomed (K) poços 7, 8, 9 A) Reação de LAMP da *B.b.s.s.* - 2µl de DNA; B) *nested*-PCR 5S(*rrl*)-23S(*rrf*) de quatro espécies de *Borrelia* - 5µl de DNA.

Verificou-se que a sensibilidade não era a expectável, tendo-se admitido que esse facto possa estar relacionado com a eficácia da extração do DNA. Como na bibliografia, grande parte das publicações documentam que a sensibilidade é determinada pela quantidade de DNA no produto extraído, na escala de nanogramas (ng), picogramas (pg) e fentogramas (fg), efetuaram-se diluições a partir de uma concentração de DNA conhecida e passou-se a utilizar apenas 1µl de DNA extraído para que a sensibilidade pudesse corresponder à quantidade exata do DNA existente na amostra.

2 – DNA conservado a -20°C

As diluições efetuadas a partir de DNA conservado a -20°C de 100ng/µl a 10fg/µl foram testadas com a técnica LAMP e obtiveram-se os seguintes valores de sensibilidade:

1. *Borrelia afzelii* - 1000pg/µl (1ng/µl);
2. *Borrelia burgdorferii* s.s. - <750pg/µl;
3. *Borrelia lusitaniae* - 1,5pg/µl;
4. *Borrelia garinii* - 1000pg/µl.

No entanto, seria expectável que o limite de deteção da técnica LAMP fosse semelhante ao das reações de *nested*-PCR, na ordem de fentogramas. Assim, com as mesmas diluições de DNA efetuaram-se as referidas reações de *nested*-PCR, com as quais também não se obtiveram os valores de sensibilidade que seriam de esperar, tendo a sensibilidade da *nested*-PCR para o gene *fla* oscilado entre os 100 e os 1000pg/µl. Perante estes resultados, a razão

da pouca sensibilidade foi atribuída à qualidade do DNA pelo que se efetuaram novas extrações de culturas de *Borrelia*.

3 – DNA extemporâneo

As concentrações das extrações de DNA obtidas a partir do mesmo tubo de cultura, efetuadas em duplicado, estão documentadas na Figura 47, verificaram-se diferenças acentuadas nas concentrações obtidas com as espécies *B. afzelii* e *B. lusitaniae*.

Extração por Hidrólise Alcalina	
	DNA ng/μl
<i>B. lusitaniae</i>	48,1
	10,8
<i>B. afzelii</i>	12,0
	53,3
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	32,2
	29,4
<i>B. garinii</i>	34,8
	32,9

Figura 47. Concentrações de DNA das espécies de *Borrelia* do complexo *B.b.s.l.* obtidas após extração por hidrólise alcalina, expressas em ng/μl a partir de culturas de cada espécie com crescimento 10^7 - 10^8 bactérias/ml.

Com as diluições a partir destes extraídos de 5ng/μl a 0,5fg/μl, efetuaram-se novamente as duas técnicas de *nested-PCR*, comparando os resultados com os obtidos com DNA conservado a -20°C . Como exemplo, apresenta-se apenas o resultado relativo ao gene *flaB*, Figura 48.

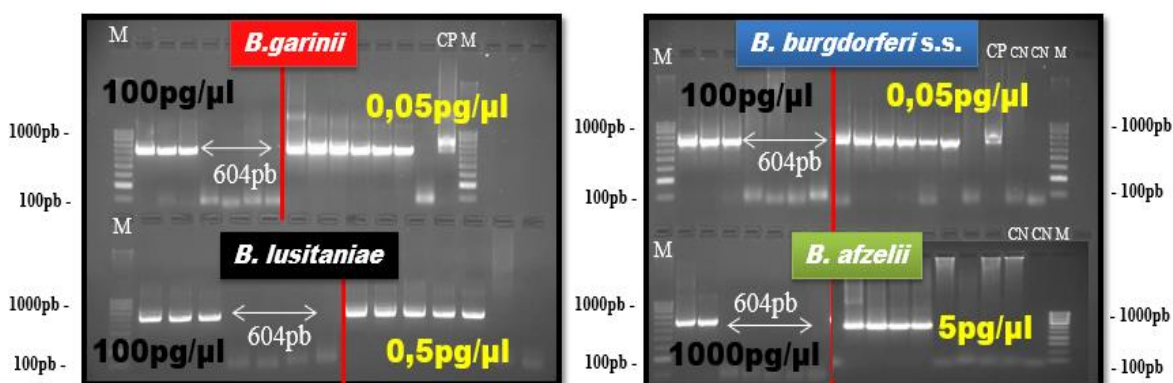


Figura 48. Comparação da sensibilidade pela *nested-PCR* para o gene *flaB* entre extrações de DNA conservado a -20°C (preto) diluições 10x de 10ng/μl a 10fg/μl e extrações de DNA recente (amarelo), diluições 10x de 5ng/μl a 5fg/μl. CP - Controlo positivo; CN – Controlo Negativo; M – Marcador.

Com as novas extrações de DNA obteve-se uma sensibilidade entre os 0,05 e 5pg/μl, um limite de detecção muito menor quando comparado com os valores de 100 a 1000pg/μl. Face a estes resultados, pode-se inferir que para a obtenção de uma maior sensibilidade devem-se utilizar extrações recentes qualquer que seja o tipo de amostra, sejam ixodídeos, amostras humanas ou culturas bacterianas.

3.2.1 - Sensibilidade da técnica LAMP

A determinação da sensibilidade foi efetuada a partir de diluições com as seguintes concentrações de DNA: 5; 2,5; 1 e 0,5ng/μl; 50; 5; 2,5 e 1pg/μl, utilizando-se um número inferior de diluições nas espécies de *Borrelia* com menor sensibilidade (*B. burgdorferi* s.s. e *B. garinii*), Figura 49.

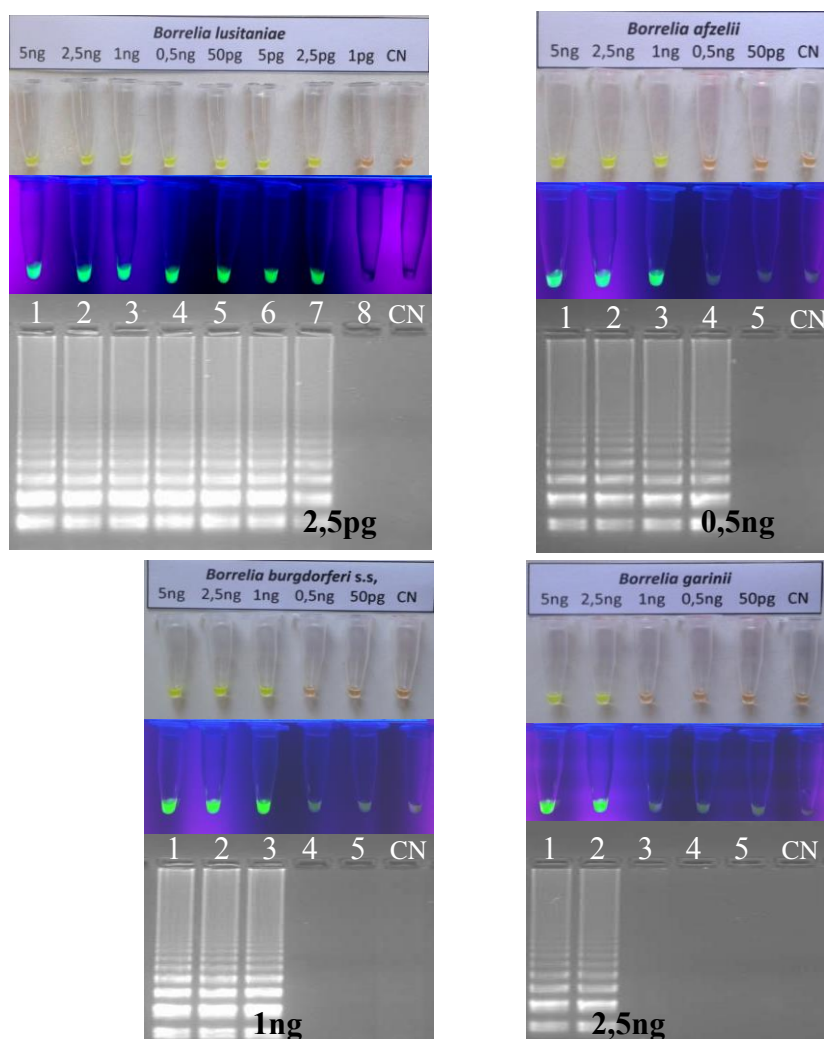


Figura 49. Sensibilidade da técnica LAMP com os *primers* para a espécie *B. lusitaniae*, de quatro espécies de *Borrelia* do complexo, com visualização dos resultados a olho nu e sob luz ultravioleta, após adição de *SybrGreen* e através de eletroforese.

3.2.2 - Sensibilidade da *nested*-PCR para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rri*)

Os resultados da sensibilidade da *nested*-PCR para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rri*) das quatro espécies de *Borrelia* com as diluições 5ng/μl a 0,5fg/μl apresentam-se na Figura 50.

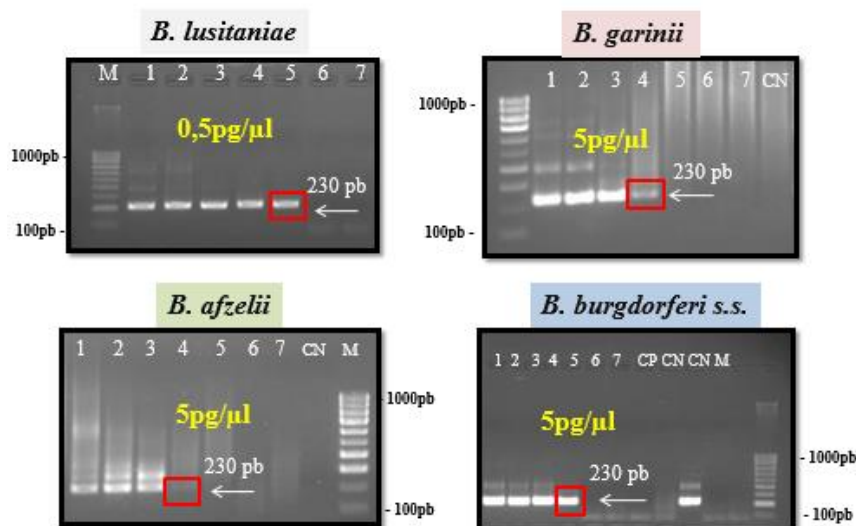


Figura 50. Sensibilidade da *nested*-PCR para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rri*), com DNA de cada uma das quatro espécies com diluições de 5; 0,5ng/μl; 50; 5; 0,5pg/μl, 50 e 5fg/μl. com indicação do limite de sensibilidade a amarelo M - Marcador; CN - Controlo Negativo; CP - Controlo Positivo.

3.2.3 - Sensibilidade da *nested*-PCR para o gene *flaB*

Os resultados da sensibilidade da *nested*-PCR para o gene *flaB* com as diluições 5; 0,5ng/μl; 50; 5; 0,5pg/μl, 50 e 5fg/μl estão documentados na Figura 51.

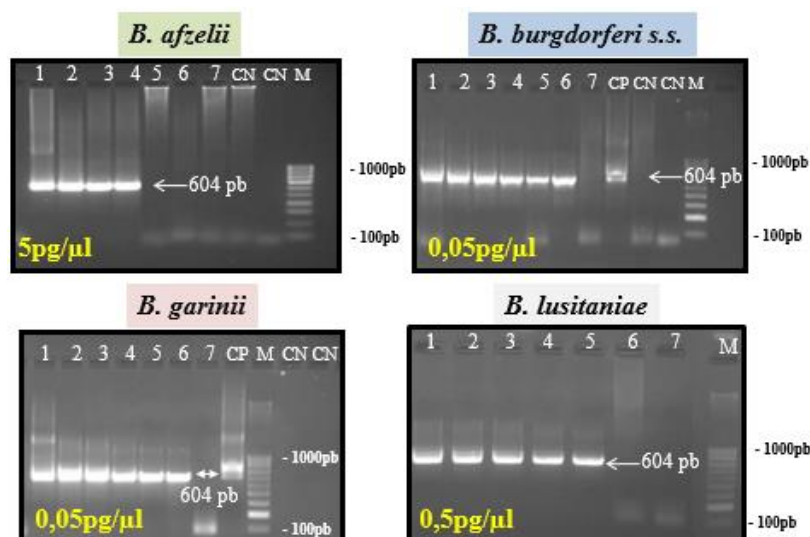


Figura 51. Sensibilidade da *nested*-PCR para o gene *flaB* com DNA de cada uma das quatro espécies com diluições de 5; 0,5ng/μl; 50; 5; 0,5pg/μl, 50 e 5fg/μl, com indicação do limite de sensibilidade a amarelo. M- Marcador; CN- Controlo Negativo; CP- Controlo Positivo

3.2.4 - Sensibilidade da PCR em tempo real (qPCR)

A determinação da sensibilidade da qPCR foi efetuada com as diluições de 5ng/μl a 0,5fg/μl para o complexo *B.b.s.l.*. A Figura 52 documenta um gráfico correspondente à leitura do sinal de fluorescência, com um limite de deteção de 0,5pg/μl e o gráfico da respetiva curva de calibração.

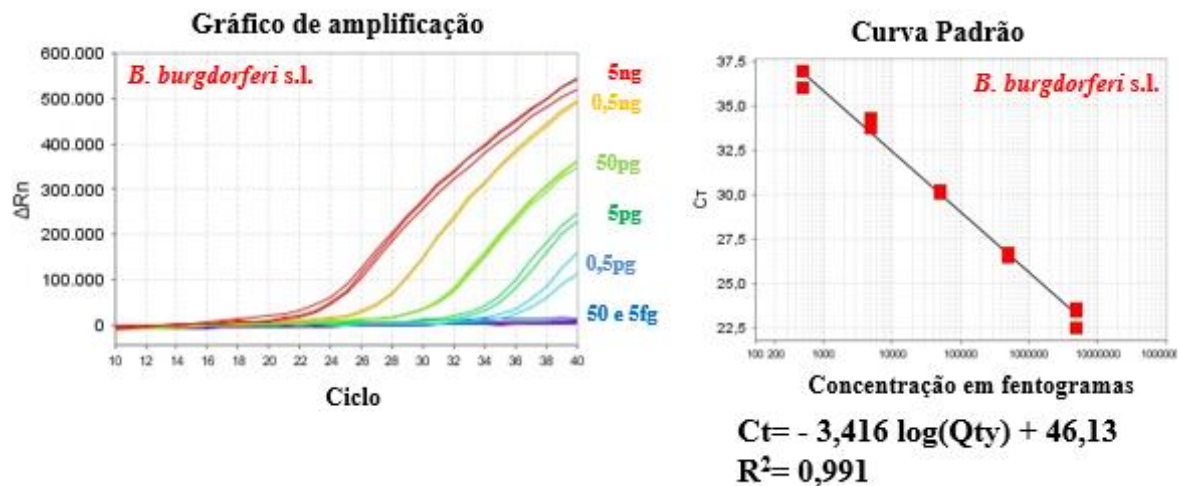


Figura 52. Sensibilidade da PCR em tempo real para o gene *flaB* com DNA de espécies do complexo *B.b.s.l.* e respetiva curva de calibração. O gráfico da esquerda apresenta a intensidade da fluorescência transmitida pela sonda quando começa a ocorrer amplificação, correspondendo cada curva a uma diluição da mistura de DNAs de seis espécies do complexo *B.b.s.l.*, o gráfico da direita corresponde à curva de calibração, com a equação a aplicar para quantificação do respetivo DNA nas amostras.

O gráfico da esquerda, evidencia que no ciclo em que se inicia a amplificação existe um aumento de fluorescência, este ciclo corresponde ao *threshold cycle*, vulgarmente designado Ct. Quanto maior a concentração de DNA alvo na amostra, mais precoce é o ciclo onde se inicia a emissão de fluorescência. O gráfico da direita representa a curva padrão, fazendo correspondência do Ct com a concentração de DNA da diluição testada. Nas amostras em que é detetado um aumento da fluorescência acima do ciclo 36 ou Ct 36, já não são consideradas como positivas, uma vez que este valor corresponde ao limite de deteção da técnica.

A garantia da qualidade dos resultados obtidos passa pela utilização de controlos internos de amplificação, assim, nos tubos de reação em que se testaram amostras humanas, adicionaram-se os *primers* para o gene da β-actina e nos tubos em que se testaram amostras

de ixodídeos, adicionaram-se os *primers* para o gene da subunidade ribossomal 18S. Para estes genes também foram efetuadas curvas de calibração, podendo a quantidade de DNA presente na amostra ser quantificada da mesma forma que foi realizado para o complexo *B.b.s.l.*.

3.2.5 - Resumo da sensibilidade obtida nas diferentes técnicas moleculares

Para se obter uma visão dos resultados de sensibilidade obtidos através das quatro técnicas moleculares de quatro espécies de *Borrelia*, apresentados nos pontos 3.2.1 a 3.2.4, os valores foram reunidos numa tabela (Tabela 17), evidenciando que os menores valores de sensibilidade foram obtidos com a técnica LAMP.

Tabela 17. Resumo dos resultados de sensibilidade obtidos nas diferentes técnicas moleculares com DNA das quatro espécies do complexo *B.b.s.l.*

	<i>Nested-PCR</i> 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>)	<i>Nested-PCR</i> gene <i>flaB</i>	qPCR gene <i>flaB</i>	LAMP gene <i>flaB</i>
<i>Borrelia afzelii</i> ,	5pg/μl	5pg/μl		500pg/μl
<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	5pg/μl	0,05pg/μl	0,5pg/μl	1000pg/μl
<i>Borrelia lusitaniae</i>	0,5pg/μl	0,5pg/μl		2,5pg/μl
<i>Borrelia garinii</i>	5pg/μl	0,05pg/μl		2500pg/μl

Para que se consiga ter uma ideia mais concreta sobre o número de bactérias a que correspondem os picogramas, recorreu-se a uma página eletrónica com um conversor (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) para se obter esses valores. Neste, é necessário saber qual o tamanho do genoma das espécies de *Borrelia*, tendo essa informação sido obtida consultando a base de dados da Pubmed. O número de cópias do genoma das quatro espécies de *Borrelia* correspondentes ao limite de deteção das técnicas moleculares descrevem-se abaixo:

- ***B.b.s.s.*** com 21 plasmídeos tem 1 215 250pb ou 1,21525Mb:
 - 0,5pg/μl = $3,81 \times 10^2$ ou 381 cópias;
 - 5pg/μl = $3,81 \times 10^3$ ou 3810 cópias;
 - 1000pg/μl = $7,62 \times 10^5$ ou 762 000 cópias.

- ***B. garinii*** com 11 plasmídeos tem 1 108 920pb ou 1,108920Mb:
 - $0,05\text{pg}/\mu\text{l} = 41,8$ cópias;
 - $0,5\text{pg}/\mu\text{l} = 4,18 \times 10^2$ ou 418 cópias;
 - $2500\text{pg}/\mu\text{l} = 2,09 \times 10^6$ ou 2090 000 cópias.

- ***B. afzelii*** com 17 plasmídeos tem 1 148 760pb ou 1,148760Mb:
 - $5\text{pg}/\mu\text{l} = 4,03 \times 10^3$ ou 4030 cópias;
 - $500\text{pg}/\mu\text{l} = 4,03 \times 10^5$ ou 403 000 cópias.

- ***B. lusitaniae***, o tamanho do seu genoma não consta na base de dados da Pubmed por essa razão foi efetuada a média do tamanho dos genomas das outras três espécies, sendo de 1 157 643pb:
 - $0,5\text{pg}/\mu\text{l} = 4 \times 10^2$ ou 400 cópias;
 - $2,5\text{pg}/\mu\text{l} = 2 \times 10^3$ ou 2500 cópias.

No entanto, existem autores a considerar que 50fg (0,05pg) de DNA de *Borrelia* correspondem a 10 cópias, citando Rijpkema e colaboradores “with 50 fg of B31 DNA (approximately 10 genome equivalents)” e “one genome equivalent (1 to 5 fg)” (48).

3.3 - Exatidão (acurácia) da técnica LAMP

A técnica LAMP e qPCR foi aplicada às 37 amostras de ixodídeos. As 22 amostras humanas, apenas foram testadas pela técnica LAMP.

A Figura 53 e 54 documenta um exemplo dos resultados obtidos com a técnica LAMP em extratos de ixodídeos e amostras humanas.

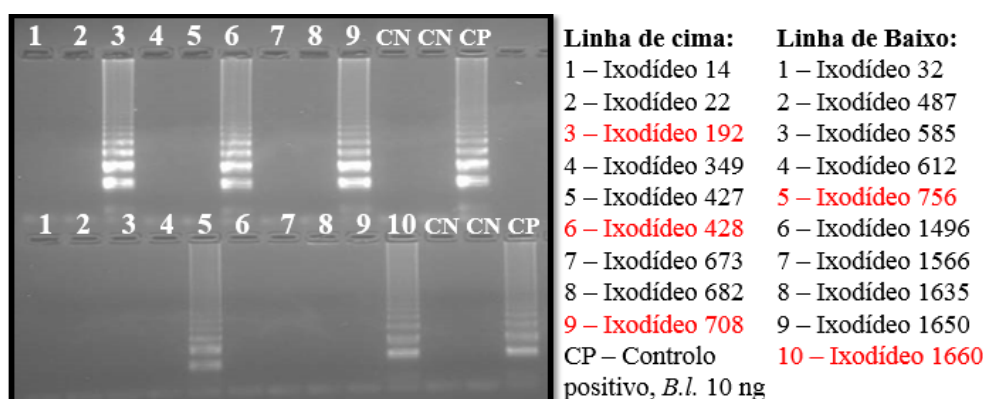


Figura 53. Visualização de alguns resultados obtidos através da técnica LAMP em amostras de ixodídeos, os positivos estão assinaladas a vermelho.

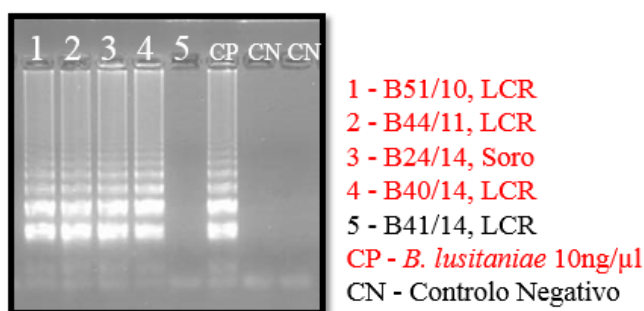


Figura 54. Visualização de alguns resultados obtidos em amostras de soro e LCR através da técnica LAMP, os positivos estão assinaladas a vermelho.

Os resultados obtidos em amostras de ixodídeos através das quatro técnicas moleculares e os obtidos em amostras humanas, apenas testadas com a técnica LAMP e *nested*-PCR para espaço intergénico 5S(*rrf*) -23S(*rrl*), foram comparados entre si e sistematizados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados obtidos com a técnica LAMP para o gene *flaB* em amostras de ixodídeos e amostras humanas face aos resultados obtidos com *nested*-PCR para o espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) e apenas de ixodídeos com a *nested*-PCR e qPCR para o gene *flaB*.

	LAMP <i>flaB</i>		
	Positivos	Negativos	Total
<i>Nested</i>-PCR 5S(<i>rrf</i>) -23S(<i>rrl</i>)			
Positivos	15	13	28
Negativos	1	30	31
Total (Ixodídeos e humanas)	16	43	59
<i>Nested</i>-PCR <i>flaB</i>			
Positivos	5	9	14
Negativos	6	17	23
Total (Ixodídeos)	11	26	37
PCR tempo real <i>flaB</i>			
Positivos	8	13	21
Negativos	3	13	16
Total (Ixodídeos)	11	26	37

Fazendo a avaliação da acurácia (exatidão) da técnica LAMP relativamente à sensibilidade e especificidade em comparação com as outras três técnicas moleculares, verificou-se que existe um melhor desempenho relativamente à *nested*-PCR 5S(*rrf*) -23S(*rrl*) (Tabela 19).

Tabela 19. Exatidão da técnica LAMP, valores percentuais de sensibilidade e especificidade relativamente às *nested*-PCR em uso no laboratório do GLBL e à técnica experimental de PCR em tempo real.

	<i>Nested</i> -PCR 5S(<i>rrf</i>) -23S(<i>rrl</i>)	<i>Nested</i> -PCR <i>flaB</i>	qPCR <i>flaB</i>
Sensibilidade	54%	37%	29%
Especificidade	97%	74%	67%

4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O conhecimento da epidemiologia da BL em Portugal é cada vez mais necessário e pertinente, devido ao crescente número e distribuição de casos na Europa, por esta razão é importante que a comunidade médica fique mais sensibilizada e, por consequência, mais alerta para esta doença perante determinados sinais e sintomas apresentados pelos doentes. Na Europa as genospecies do complexo *B.b.s.l.* mais prevalentes são *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* e *B. valaisiana*, sendo que em Portugal a espécie *B. lusitaniae* tem igualmente uma elevada prevalência ao nível do vetor. No diagnóstico laboratorial, a técnica *Gold standard* é a deteção de anticorpos anti-*B.b.s.l.*. A resposta do sistema imunitário com a produção de anticorpos inicia-se na generalidade dos casos duas a três semanas após a infeção, atingindo um pico entre as seis e oito semanas para a IgM e quatro a seis meses para a IgG. Devido a este grande intervalo de tempo, é necessário desenvolver novos métodos laboratoriais para um diagnóstico precoce e tratamento apropriado da BL (24).

Os testes moleculares para a deteção de espiroquetas do complexo *B.b.s.l.*, em amostras biológicas têm estado em desenvolvimento há alguns anos sem, no entanto, se tornarem o método de diagnóstico *Gold standard*. Na prática laboratorial, consoante o tipo de amostra, esses testes apoiam o diagnóstico como abordagem paralela aos testes serológicos, funcionando bem nos casos de doença aguda. Os testes moleculares servem assim, para confirmar o diagnóstico quando os métodos serológicos não o conseguem estabelecer, quer numa fase precoce da doença, quando a resposta de anticorpos é indetetável, quer numa fase tardia ou suspeita de reinfeção, devido à presença de anticorpos que podem permanecer durante muitos anos após a infeção primária (24).

Desta forma, a necessidade de desenvolver técnicas de diagnóstico com maior acurácia, mais sensíveis, rápidas e fáceis de executar torna-se uma prioridade. Ao nível da investigação tem sido feita uma grande aposta na amplificação isotérmica sendo a técnica LAMP uma das mais utilizadas. Esta técnica foi introduzida há 15 anos por Notomi e colaboradores em 2000, tendo a vantagem de ser uma técnica rápida, sensível e que ocorre num único tubo resultando num número de cópias de DNA na ordem de 10^9 em cerca de uma hora.

Este método tem uma elevada especificidade, pois utiliza quatro *primers* que reconhecem seis regiões do DNA alvo. Esta especificidade pode ainda ser incrementada através da utilização de um par de *primers* adicional, designados por *primers loop*. Uma outra vantagem deste método é o facto do resultado final da amplificação poder ser visualizado diretamente a olho nu ou por adição de *SybrGreen*, não sendo necessário equipamento sofisticado. Esta amplificação apenas utiliza um banho-maria ou um termobloco com temperatura constante. Idealmente deveria associar-se esta técnica a um turbidímetro, conseguindo-se obter um resultado de amplificação em tempo real e com maior sensibilidade (49, 50). Recentemente esta técnica foi acoplada a um microdispositivo multiplex (teste *point of care*), permitindo detetar várias bactérias patogénicas alimentares (51).

No que respeita à sensibilidade da técnica LAMP, esta é menos afetada por alguns dos constituintes das amostras clínicas, comparativamente à técnica convencional de PCR, não sendo por isso necessária a purificação das amostras (52).

Relativamente à aplicação da técnica LAMP às espécies do complexo *B.b.s.l.*, Yang e colaboradores em 2013 (30), intervieram no desenvolvimento da mesma, tendo como alvo uma zona muito conservada do gene 16S do rRNA, aplicando-a apenas a carraças. Ainda este ano, Zhang e colaboradores (49) anteciparam-se à elaboração desta dissertação e publicaram um trabalho com o desenho da técnica LAMP para o gene *fla* das borrelíias do complexo *B.b.s.l.*

O intuito deste trabalho foi assim, contribuir para o desenvolvimento da técnica LAMP tendo como alvo o gene da flagelina, não apenas para a deteção das borrelíias do complexo *B.b.s.l.* mas para a identificação molecular de quatro das genospecies atrás referidas. Este gene apresenta uma variabilidade interespecífica reconhecida. Este conhecimento foi baseado em estudos como o de Shih *et al.* (2002), referindo que a diversidade do gene *fla* é de grande valia para distinguir a heterogeneidade genética entre os diferentes isolados de *Borrelia* spp (53). Reforçando esta ideia, em 2000, Wodecka e colaboradores afirmaram que este gene é o alvo molecular mais sensível para a deteção destas espiroquetas uma vez que a análise molecular por PCR-RFLP, identificou todas as espécies do complexo *B.b.s.l.*, que existiam

no vetor incluindo co-infecções, e outras espécies pertencentes ao complexo das borrelíias da febre recorrente, nomeadamente a espécie *B. myamotoi* (25).

Assim, foram desenhados quatro conjuntos de *primers* específicos para cada uma das quatro espécies com o objetivo de se efetuarem duas técnicas LAMP duplex, para identificação das genospecies duas a duas em simultâneo.

Após o desenho dos *primers* para cada uma das espécies, testou-se a especificidade de cada conjunto, verificando-se que existe especificidade de género mas não de espécie, ou seja, cada conjunto de *primers* amplificou não só a espécie pretendida como também uma das outras espécies ou até mesmo as quatro espécies de *Borrelia* no caso dos conjuntos desenhados para a *B. lusitaniae* e *B.b.s.s.* Uma explicação para este facto é que os três a seis nucleótidos diferentes entre os fragmentos de DNA do gene *flaB* de cada espécie com cerca de 300pb, para o qual foram desenhados os *primers*, **revelou que estas diferenças não foram suficientes** para obter a distinção entre espécies.

Devido à falta de especificidade dos primers para a espécie, de modo a cumprir/desenvolver o objetivo inicial, efectuou-se uma pesquisa bibliográfica de forma a encontrar uma alternativa que se pudesse associar a um dos conjuntos de *primers* LAMP previamente desenhados. Assim, de acordo com Mori *et al.*, 2006 (41), que utilizaram sondas marcadas com diferentes fluorocromos para os *primers loop* num duplex LAMP para a identificação de dois vírus diferentes na reação, no presente trabalho foi ensaiada uma adaptação do mesmo conceito, no entanto, as sondas para os *primers loop* dos conjuntos LAMP não poderiam ser utilizadas para distinguir as espécies, uma vez que não eram estes não eram específicos de espécie. Desta forma, foram desenhadas sondas marcadas que se ligavam a uma sequência do produto a amplificar/amplificado e que teriam especificidade de espécie, permitindo a identificação molecular de quatro espécies do complexo *B.b.s.l.*. O objetivo seria obter um sedimento da cor do fluorocromo da sonda, na presença ou ausência da espécie para a qual esta foi desenhada. No entanto, os sedimentos obtidos após a reação de LAMP tinham todos a mesma cor, vermelha ou verde de acordo com a marcação da sonda, independentemente de estar na presença ou ausência da espécie para a qual esta fora desenhada. Uma das razões que pode explicar este resultado é a concentração de PEI, que estando em excesso, pode ligar-se às sondas livres ficando estas retidas no sedimento,

originando falsos positivos. Outra possível explicação para estes falsos positivos, pode ser a concentração das sondas utilizadas e o facto de estas apresentarem um fluorocromo livre estando sempre a emitir fluorescência. Esta abordagem foi abandonada uma vez que não se conseguiu obter uma identificação molecular das espécies e porque exigiria mais investimento de tempo na otimização das condições da reação.

Relativamente à determinação da sensibilidade da técnica LAMP para as quatro espécies de *Borrelia* em estudo, a mesma foi iniciada com a extração a partir da diluição de culturas dessas espécies. No entanto, após obtenção de um resultado com baixa sensibilidade de $10^6 - 10^3$ bactérias/ml quer com a técnica LAMP quer com as reações *nested*-PCR, colocou-se em causa a efetiva concentração de DNA obtida após as extrações uma vez que as borrelíias devido à constituição da sua membrana, são difíceis de lisar, não correspondendo o número de bactérias à quantidade de DNA obtido.

De facto, foi constatado que em extrações posteriores efetuadas em duplicado a partir do mesmo tubo de cultura, se obtinham concentrações de DNA diferentes, umas mais elevadas do que outras, por exemplo, com *B. lusitaniae* num duplicado obteve-se 48,1ng/μl e noutro 10,8ng/μl, o que veio reforçar o argumento que fundamentou o abandono da determinação da sensibilidade a partir de extrações baseadas em diluições de culturas. Assim, para se ser preciso na determinação do limite de deteção de uma técnica, é necessário quantificar o DNA obtido após a extração e acertar à concentração pretendida, efetuando-se a partir desta as sucessivas diluições.

Com base nesta conclusão, a partir de DNA extraído das diversas espécies de *Borrelia* do complexo *B.b.s.l.* conservado a -20°C no laboratório do GLBL, foi realizada a determinação da concentração do DNA em ng/μl, voltando, a obter-se uma sensibilidade diminuta. Face a este resultado colocou-se em causa a integridade do DNA, pois este já estava extraído há alguns meses e encontrava-se conservado a -20°C. Assim, foram efetuadas novas extrações de DNA de culturas recentes das referidas quatro espécies de *Borrelia*. Foram testadas com as técnicas de *nested*-PCR no que respeita à sensibilidade, tendo esta sido mais expressiva com as novas extrações, foi disto exemplo o limite de deteção de DNA da espécie *B. lusitaniae* que passou de 100pg/μl para 0,5pg/μl. Com estes resultados, concluiu-se que as

técnicas de PCR foram fortemente afetadas pelas condições de conservação da amostra ou por substâncias que pudessem estar presentes nas mesmas. No entanto, este facto não se verificou com a técnica LAMP com o DNA conservado a -20°C da espécie *B. lusitaniae*, uma vez que se obteve um limite de deteção de 1,5pg/μl, valor inferior ao obtido posteriormente com o protocolo final da técnica LAMP de 2,5pg/μl, o que está de acordo com Kaneko *et al.* (2007) (52), que referem que esta técnica é menos influenciada pela presença de substâncias que possam interferir na amplificação do que a que se verifica numa técnica convencional de PCR.

Uma vez que a técnica LAMP é altamente sensível, ao fim de algum tempo surgiram **amplificações inespecíficas** ao nível dos controlos negativos de amplificação. Assim, foram aplicadas medidas mais cautelosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais, no entanto sem grande sucesso. Primeiramente chegou a colocar-se a hipótese de os *primers* estarem contaminados, posteriormente a enzima, tendo-se comprovado à posteriori que o problema não residia nos reagentes.

Uma vez mais, com base na pesquisa bibliográfica, sobre como contornar as contaminações com a técnica LAMP, ficou a saber-se que recentemente (2015), Wang e colaboradores descreveram a existência do mesmo problema, evidenciando a existência de amplificações inespecíficas devido à ocorrência de dímeros de *primers*, uma das razões para os resultados falsos positivos obtidos na reação LAMP (54). Uma das formas encontradas por estes autores para contornar este problema foi efetuar uma reação com as temperaturas em *touchdown*, tendo como base a ideia de Darren *et al.* (2008), que demonstraram que a PCR por *touchdown* é um meio rápido e simples para eliminar amplificações inespecíficas, aumentando a especificidade e sensibilidade. Esta abordagem em *touchdown* utiliza uma temperatura acima da temperatura de ligação dos *primers* que progressivamente vai descendo até atingir a temperatura ideal de ligação dos mesmos, assim, estes apenas se ligam às sequências específicas, eliminando-se possíveis amplificações inespecíficas (55).

Esta abordagem foi então utilizada neste trabalho, na técnica LAMP, juntamente com o aumento da concentração de betaína de 0,8M para 1M, uma vez que a betaína impede a formação de estruturas secundárias nas regiões do DNA ricas nos nucleótidos guanina e

citossina, aumentando a especificidade da ligação dos *primers* (40). Nestas condições, conseguiram-se obter resultados sem ampliações inespecíficas. No entanto, o conceito de simplicidade da reação LAMP ficou posto em causa. Assim, efetuou-se a reação isotérmica mantendo a concentração da betaína a 1M e em simultâneo testaram-se as temperaturas acima dos 65°C, obtendo-se então bons resultados a 68°C, sem ampliações inespecíficas, passando a ser esta a temperatura do protocolo.

O trabalho de Wang *et al.* (2015), corrobora a existência de ampliações inespecíficas, afirmando que é difícil evitar os dímeros de *primers* quando se utilizam vários *primers*, citando outros autores que afirmam que as concentrações de *primers*, Mg²⁺, dNTPs e DNA polimerase devem ser estritamente controlados para evitar a amplificação não específica em PCR em tempo real, bem como nas reacções da técnica LAMP (54). O mesmo autor e colaboradores, também neste ano de 2015, publicaram um outro trabalho em que avaliam a aplicação da técnica LAMP *in house* desenvolvida por outros autores, para 12 espécies de bactérias, comparando os resultados com a técnica LAMP efetuada com um kit comercial, “Isothermal Master Mix, OptiGene, Horsham, UK”, para as mesmas espécies. Verificando que em todas as reacções LAMP *in house* se obtiveram ampliações inespecíficas nos controlos negativos não obtendo nenhuma amplificação inespecífica com o kit comercial, pelo que os referidos autores concluem que aquelas ocorrem devido à formação de dímeros de *primers* (56).

Após a determinação da sensibilidade das espécies de *Borrelia* com a técnica LAMP e as técnicas de *nested*-PCR, verificou-se que a espécie *B. lusitaniae*, com a técnica LAMP apresentou uma sensibilidade de 2,5pg/μl e de 0,5pg/μl quando sujeita a qualquer uma das duas reacções de *nested*-PCR. Esta diferença não foi muito acentuada quando comparada com os limites de deteção destas técnicas para as outras espécies, verificando-se que relativamente à espécie de *B. garinii* o limite de deteção foi de 2500pg/μl com a técnica LAMP e de 5 e 0,05pg/μl nas reacções *nested*-PCR, este facto é facilmente justificado, uma vez que o conjunto de *primers* utilizado foi especificamente desenhado para a espécie *B. lusitaniae*. Relativamente à sensibilidade da referida espécie, o aumento de temperatura na técnica LAMP, apesar de evitar o aparecimento de ligações inespecíficas, aumentou o limite de deteção, dado que a 65°C o limite de deteção foi menor (1pg/μl).

Na literatura existe uma grande variabilidade nos valores de sensibilidade por esta técnica, Pooja *et al.* (2014), compararam a sensibilidade obtida em técnicas LAMP desenhadas para várias espécies de bactérias e os valores variavam entre 0,005pg para *Mycobacterium tuberculosis* e 2500pg/μl para *Staphylococcus aureus* (32), o que permitiu verificar que os valores obtidos no presente trabalho, se incluem neste intervalo.

De facto a técnica LAMP é de fácil execução e rápida, conseguindo-se fazer uma leitura visual do resultado através da turvação, tendo diversos autores concluído que a sensibilidade da técnica é equivalente à das reações *nested*-PCR e 10 vezes mais sensível do que a técnica de PCR convencional (57, 58).

No entanto, os resultados de sensibilidade obtidos neste trabalho contrastam com os descritos por Yang *et al.* (2013), que desenvolveram a técnica LAMP tendo como alvo o gene 16S (*rrs*) do complexo *B.b.s.l.* com níveis de deteção de DNA de 0,2pg (10² cópias/μl) para *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s. e de 0,02pg (10 cópias/μl) para *B. garinii*, tendo os valores de sensibilidade sido substancialmente mais baixos (30). Outro exemplo é o trabalho publicado este ano (2015) por Zhang e colaboradores, que desenharam a técnica LAMP para o gene *fla* das borrelíias do complexo *B.b.s.l.*, utilizando o kit *Loopamp DNA amplification* (*Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan*), e obtiveram uma sensibilidade idêntica à do estudo anterior com um limite de deteção de 10 cópias/μL ou 0,02pg (49). A razão que justifica a grande diferença de sensibilidade apresentada nesta dissertação é o facto de os *primers* para o gene *flaB* não terem sido desenhados para o género *Borrelia*, mas sim para cada uma das espécies, tendo sido utilizado um dos conjuntos de *primers*, para a espécie *B. lusitaniae*, o qual amplificou as quatro espécies.

A importância de se obter uma técnica com um limite de deteção mais baixo para complexo *B.b.s.l.*, é conseguir-se detetar DNA desta bactéria em amostras de doentes numa fase inicial da doença, uma vez que quando a espiroqueta é transmitida pelo vetor geralmente o inóculo é muito baixo. Alby e Carparo, 2015 referem que para maximizar a sensibilidade das técnicas moleculares de PCR, deve-se considerar a utilização de uma estratégia de dois alvos de amplificação, como ferramentas de diagnóstico complementar às técnicas serológicas (24).

No que diz respeito à sensibilidade da *nested*-PCR do espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) do rDNA para o complexo *B.b.s.l.*, obtiveram-se diferentes limites de deteção para cada uma das espécies, situados entre 0,5 e 5pg/ μ l, com a mesma técnica Rijpkema *et al.* (1995) já haviam obtido uma sensibilidade de 5fg (0,005pg) (43). Uma das possíveis razões desta diferença pode ser o facto de os autores terem utilizado um volume de 5 μ l de cada diluição, e no presente trabalho apenas se utilizou o volume de 1 μ l.

Relativamente à sensibilidade obtida com a *nested*-PCR para o gene *fla*, entre 0,05 e 5pg/ μ l, os autores que desenharam os *primers* não documentam a determinação da sensibilidade. Trabalhos publicados por Picken *et al.*, 1996 (59) e Yukita *et al.*, 1997 (60), que também desenvolveram *primers* para o gene *fla*, documentam limites de deteção de 10 a 10² espiroquetas/ml sem especificar a espécie testada, valores que correspondem à ordem de grandeza de 0,05pg/ μ l.

Fazendo uma análise do que é relatado como limite de deteção nos vários artigos há que ser rigorosos na avaliação da quantidade de DNA *vs* bactérias efetivamente detetadas, para existir um ponto de comparação. Nesta dissertação, ao se efetuar a correspondência rigorosa do tamanho do genoma das espécies de *Borrelia*, efetuando-se a equivalência entre nanogramas e o número de bactérias, no caso de *B.b.s.s.*, 50fg ou 0,05pg correspondem a cerca de 38 espiroquetas, noutros artigos refere-se que este mesmo valor corresponde a 10 bactérias. Sabendo-se que hoje em dia existem aparelhos que nos permitem obter uma quantificação de DNA mais fidedigna, seria uma mais valia a existência de uma padronização da correspondência do valor de picogramas ou fentogramas ao número de bactérias. Outro parâmetro que carece de padronização são as concentrações das diluições de DNA a utilizar na obtenção dos limites de deteção de uma técnica molecular, permitindo que a comparação da performance entre técnicas moleculares seja mais rigorosa. Relativamente às borrelíias, tem de existir a consciência de que existe uma variação nos valores de sensibilidade consoante a espécie utilizada, dever-se-á optar por se relatar a sensibilidade por espécie ou efetuar uma mistura de DNA de várias espécies para relatar apenas um valor de limite de deteção, como foi efetuado nesta dissertação para a qPCR.

Comparando os limites de detecção das duas *nested*-PCR para o género *Borrelia* a técnica em que se obteve 50fg/µl foi a *nested*-PCR para o gene *flaB* nas espécies *B.b.s.s.* e *B. garinii*, comparativamente aos 5pg/µl obtidos na *nested*-PCR para o espaço intergénico. Relativamente às espécies *B. lusitaniae* e *B. afzelii*, o valor alcançado foi mesmo, de 5pg/µl nas duas técnicas.

Ao avaliar a exatidão da técnica LAMP em amostras de ixodídeos e humanas, quando em comparação com a qPCR, *nested*-PCR para o gene *fla* e espaço intergénico, obtiveram-se percentagens baixas de sensibilidade de 29%, 37% e 54% respetivamente, ou seja, a técnica LAMP não foi muito eficaz a detetar a presença de DNA de *Borrelia* nas amostra testadas. Esta constatação pode, no entanto, ser justificada pela presença de várias espécies de *Borrelia* nas carraças, e que dada a pouca sensibilidade da técnica foi impeditivo de detetá-las. Os valores da especificidade foram, por sua vez, mais elevados, com 97% quando comparada com a *nested*-PCR para o espaço intergénico, 74% e 67% quando comparada com *nested*-PCR e qPCR para o gene *flaB* respetivamente, ou seja, a técnica LAMP foi mais eficaz em não detetar DNA de *Borrelia* na ausência do mesmo.

O caminho a seguir para se alcançar uma melhoria dos valores associados à exatidão do teste, é o de se conseguir um limite de detecção mais baixo (o ótimo seria conseguir detetar 5fg, valor que corresponde aproximadamente a uma cópia de DNA de *Borrelia* (48)) e a eliminação das amplificações inespecíficas. Com este objetivo, sugere-se a utilização de uma *master mix* comercializada para a técnica LAMP, sendo que esta contém as concentrações otimizadas dos vários reagentes, não ocorrendo amplificações inespecíficas, de acordo com o trabalho de Wang *et al.* 2015 (56), no entanto, os mesmos autores documentam a obtenção de um limite de detecção de 1pg/µl (100fg) em várias espécies. Pretendendo-se atingir um valor mais baixo, e na sequência da experiência obtida nesta dissertação, pode associar-se a utilização desta *master mix* à variação da temperatura e à concentração de MgSO₄, uma vez que se observou uma melhoria do limite de detecção quando a concentração de MgSO₄ é mais elevada e quando se diminui a temperatura.

O objetivo inicial de realização de um duplex LAMP de forma a obter uma identificação molecular direta, não foi conseguido, uma vez que os conjuntos de *primers* para uma

determinada espécie de *Borrelia* mostraram não serem específicos, amplificando outras espécies de *Borrelia*. Ainda na tentativa de contornar esta dificuldade experimentou-se uma outra abordagem, com a utilização de sondas específicas de espécie marcadas com fluorocromos, não se tendo conseguido obter a identificação molecular das mesmas.

No entanto, no decurso da otimização das condições de amplificação ficaram algumas conclusões importantes para a elaboração de trabalhos futuros: *i)* Para uma determinação precisa do limite de deteção de uma técnica molecular é fundamental proceder ao doseamento da concentração de DNA obtido após extração da(s) cultura(s), para posteriormente se ajustar à concentração desejada e efetuar as diluições; *ii)* Na técnica LAMP a produção de DNA por tubo é muito elevada, pelo que a abertura dos tubos apenas se deve efetuar numa área restrita do laboratório; *iii)* Importa ter presente que a probabilidade de se obterem amplificações inespecíficas devido à formação de dímeros de *primers* é muito elevada, não devendo o aparecimento dessas amplificações, no controlo negativo, ser de imediato atribuído à contaminação de algum reagente, pelo que é importante efetuar-se dois a três controlos negativos dependendo do número de amostras a testar, tendo presente que as amostras em avaliação com resultado positivo, carecem sempre de uma confirmação posterior; *iv)* Sugere-se também que deve ser realizada a diluição dos *primers* a partir do tubo mãe, ou seja, conservar a -20°C alíquotas deste, em vez de os conservar já diluídos na concentração de trabalho; *v)* Sugere-se ainda utilizar uma mistura de reação de 10µl em vez de 25µl, na fase de otimização da técnica, o que se traduz numa grande poupança em reagentes.

A técnica LAMP mostrou ser de fácil execução, ocorrendo a reação durante 45 minutos, com visualização do resultado a olho nu, relativamente à espécie *B. lusitaniae*, para a qual foram desenhados os *primers*, tendo-se obtido uma sensibilidade próxima à das reações de *nested-PCR*. Neste trabalho ficou demonstrada outra grande vantagem desta técnica, a amplificação não ter sido afetada por substâncias interferentes que existam na amostra ou pelas condições de preservação do DNA, o que permite que esta técnica possa vir a ser utilizada diretamente em amostras de sangue, uma vez que está documentada a existência de inibição da amplificação em técnicas de PCR pela heparina e hemoglobina.

Relativamente à exatidão da técnica LAMP, os valores de especificidade e sensibilidade obtidos não foram os expectáveis, no entanto, tendo que se obteve pouca sensibilidade para as outras espécies com os *primers* desenhados para *B. lusitaniae*. Admite-se que esta terá sido a razão para que o número de positivos nas amostras tenha sido inferior comparativamente aos obtidos com as outras técnicas moleculares.

O diagnóstico da BL continua, apesar de tudo, a ser um grande desafio. É de esperar assim, que a continua procura de métodos de diagnóstico para detetar as espiroquetas do complexo *B.b.s.l.*, seja um caminho que conduza a uma melhor performance deste e por consequência permita encontrar “novas” opções para um diagnóstico laboratorial mais eficaz da BL enquanto doença emergente, também em nosso país.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Franke, J., A. Hildebrandt and W. Dorn.** 2013. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and Tick-borne Diseases*. **4**(1-2):11–25.
2. **Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. **28**(12):e63.
3. **Fukunaga, M., K. Okada, M. Nakao, T. Konishi and Y. Sato.** 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **46**(4):898–905.
4. **Borchers, A. T., C. L. Keen, A. C. Huntley and M. E. Gershwin.** 2015. Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*. **57**:82–115.
5. **Stanek, G., M. Reiter.** 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species?. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**(4):487–93.
6. **Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner.** 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **34**(4):496–7.
7. **Stanek, G., G. P. Wormser, J. Gray and F. Strle.** 2012. Lyme borreliosis. *The Lancet*. **379**:461–73.
8. **Collares-Pereira, M., S. Couceiro, I. Franca, K. Kurtenbach, S. M. Schäfer, L. Vitorino, L. Gonçalves, S. Baptista, M. L. Vieira and C. Cunha.** 2004. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**(3):1316–8.
9. **Rudenko, N., M. Golovchenko and L. O. J. Grubhoffer.** 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases*. **2**(3):123–8.
10. **Canas Ferreira, W. F., and J. C. Sousa.** 2000. Microbiologia. LIDEL-Edições Técnicas, Lda; Volume 2, pág.259-290.

11. **Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. Van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith and J. C. Venter.** 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. **390**(6660):580–6.
12. **Krupka, M., M. Raska, J. Belakova, M. Horynova, R. Novotny and E. Weigl.** 2007. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. **151**(2):175–86.
13. **Rosa, P. A., K. Tilly, P. E. Stewart and R. Mountain.** 2005. The Burgeoning molecular Genetics of Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews, Microbiology*. **3**(2):129–43.
14. **Gray, J., O. Kahl, R. S. Lane and G. Stanek.** 2002. Lyme Borreliosis: Biology Epidemiology and control. International C, editor. History and Characteristics of Lyme Borreliosis. CABI Publishing; Capítulo 1.
15. **Sunder, S. and L. Bernard.** 2015. Borreliosis de Lyme. *EMC - Tratado de Medicina*. **19**(1):1–7.
16. **Radolf, J. D., M. J. Caimano, B. Stevenson and L. T. Hu.** 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews, Microbiology*. **10**(2):87–99.
17. **Rizzoli, A., H. C. Hauffe, G. Carpi, G. I. Vourc'h, M. Neteler and R. Rosà.** 2011. Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*. **16**(27):1–8.
18. **Stanek, G., V. Fingerle, K.- P. Hunfeld, B. Jaulhac, R. Kaiser, A. Krause, W. Kristoferitsch, S. O'Connell, K. Ornstein, F. Strle and J. Gray1.** 2011. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. **17**(1):69–79.
19. **Klempner, M. S. and P. J. Molloy.** 1992. Lyme disease. *New England Journal of Medicine*. **327**:1793.
20. **Lindgren, E. and T. G. T. Jaenson.** 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *World Health Organization*.
21. **Vázquez-López, M. E., R. Pego-Reigosa, C. Díez-Morrondo, M. Castro-Gago, P. Díaz, G. Fernández and P. Morrondo** 2015. Epidemiología de la enfermedad de Lyme en un área sanitaria del noroeste de España. *Gaceta Sanitaria*. **29**(3):213–6.

22. **Lopes de Carvalho, I. and M. S. Nuncio.** 2006. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro surveillance - European Communicable Disease Bulletin.* **11**:257-60.
23. **Aguero-Rosenfeld, M. E., G. Wang, I. Schwartz and G. P. Wormser.** 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews.* **18**(3):484–509.
24. **Alby, K., and G. A. Capraro.** 2015. Alternatives to Serologic Testing for Diagnosis of Lyme Disease. *Clinics in Laboratory Medicine.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.07.005>.
25. **Wodecka, B., A. Leńska and B. Skotarczak.** 2010. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *Journal of Medical Microbiology.* **59**:309–14.
26. **Postic, D., M. V. Assous, P. A. Grimont and G. Baranton.** 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **44**(4):743–52.
27. **Clark, K., A. Hendricks and D. Burge.** 2005. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**(5):2616–25.
28. **Wang, G., A. P. Van Dam, I. Schwartz and J. Dankert.** 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews.* **12**(4):633–53.
29. **Laohasinnarong, D.** 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP): An Alternative Molecular Diagnosis. *Journal of Applied Animal Science.* **4**(3):9–19.
30. **Yang, J., G. Guan, Q. Niu, Z. Liu, Y. Li, J. Liu, J. Luo and H. Yin.** 2013. Development and Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Ticks. *Transboundary and Emerging Diseases.* **60**(3):238–44.
31. **Yang, J., Z. Liu, G. Guan, R. Che, Q. Niu, Y. Li, I. Junlong, M. Miling, R. Qiaoyun, L. Aihong, L. Jianxun and Y. Hong.** 2012. Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **73**(1):80–3.
32. **Saharan, P., S. Dhingolia, P. Khatri, J. S. Duhan and S. K. Gahlawat.** 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *African Journal of Biotechnology.* **13**(19):1920–8.
33. **Yeh, H. Y., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius.** 2005. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish

- Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Microbiological Methods*. **63**:36–44.
34. **Tomita, N., Y. Mori, H. Kanda and T. Notomi.** 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. **3**(5):877–82.
35. **Wang, Q., Y. Zhou, S. Li, C. Zhuo, S. Xu, L. Huang, L. Yang and K. Liao.** 2013. Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. **8**(7):1–7.
36. **Li, Y., L. Shi, A. Pan, W. Cao, X. Chen, H. Meng, H. Yan and S. Miyoshi.** 2014. Evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples. *Journal of Microbiological Methods*. **104**:55–8.
37. **Reyes, J. C. B., J. A. A. Solon and W. L. Rivera.** 2014. Development of a Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **79**(3):337–41.
38. **Gonçalves, D. D. S., A. P. A. Cassimiro, C. D. Oliveira, N. B. Rodrigues and L. A. Moreira.** 2014. *Wolbachia* detection in insects through LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Parasites & Vectors*. **7**(1):228.
39. **Markoulatos, P., N. Sifakas and M. Moncany.** 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **16**(1):47–51.
40. **Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr and S. A. Loening.** 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. **25**(19):3957–8.
41. **Mori, Y., T. Hirano and T. Notomi.** 2006. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*. **6**:3.
42. **Fukunaga, M., Y. Yanagihara and M. Sohnaka.** 1992. The 23S/5S ribosomal RNA genes (*rrl/rrf*) are separate from the 16S ribosomal RNA gene (*rrs*) in *Borrelia burgdorferi*, the aetiological agent of Lyme disease. *Journal of General Microbiology*. **138**(5):871–7.
43. **Rijpkema, S. G. T., M. J. C. H. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan and J. F. P. Schellekens.** 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**(12):3091–5.
44. **Costa, P. M. N.** 2014. Improved nucleic acid testing strategies to detect and discriminate veterinary relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex members. Tese de doutoramento, Universidade Nova de Lisboa.

45. **Douglas, G. A. and J. Martin Bland.** 1994. Diagnostic test. 1: sensitivity and specificity. *BMJ*. **308**:1552.
46. **Akobeng, A. K.** 2007. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica*. **96**(3):338–41.
47. **Guy, E. C. and G. Stanek.** 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*. **44**(7):610–1.
48. **Rijpkerna, S. G. T., D. Taxelaar, M. C. H. Molkenboer, G. Noordhoek, G. Plantinga, L. M. Schouls and J. E. Schellekens.** 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *B burgdorferi* s.s., *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical Microbiology and Infection*. **3**(1):109–16.
49. **Zhang, L. L., X. X. Hou, Z. Geng, Y. L. Lou, K. L. Wan and Q. Hao.** 2015. Combination of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Nested PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Human. *Biomedical and Environmental Sciences*. **28**(4):312–5.
50. **Kouzaki, Y., T. Maeda, H. Sasaki, S. Tamura, T. Hamamoto, A. Yuki, A. Sato, Y. Miyahira and A. Kawana.** 2015. A Simple and Rapid Identification Method for *Mycobacterium bovis* BCG with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE*. 10(7):e0133759. doi:10.1371/journal.pone.0133759.
51. **Jun Oh, S., B. P. Hyun, J. J. Hwan, G. Choi, D. C. Lee, D. H. Kim and T. Seok Seo.** 2015. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*. **75**:293–300.
52. **Kaneko, H., T. Kawana, E. Fukushima and T. Suzutani.** 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **70**(3):499–501.
53. **Shih, C. M., L.-L. Chao.** 2002. Genetic analysis of the outer surface protein C gene of Lyme disease spirochaetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) isolated from rodents in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*. **51**(4):318–25.
54. **Wang, D. G., J. Brewster, M. Paul, P. Tomasula.** 2015. Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Molecules*. **20**(4):6048–59.
55. **Korbie, D. J. and J. S. Mattick.** 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*. **3**(9):1452–6.

56. **Wang, D., Y. Wang, F. Xiao, W. Guo, Y. Zhang, A. Wang and Y. Liu.** 2015. A Comparison of In-House Real-Time LAMP Assays with a Commercial Assay for the Detection of Pathogenic Bacteria. *Molecules*. **20**(6):9487–95.
57. **Aryan, E., M. Makvandi, A. Farajzadeh, K. Huygen, P. Bifani, S. L. Mousavi, et al.** 2010; A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiological Research*. 165(3):211–20.
58. **Zhou, D., J. Guo, L. Xu, S. Gao, Q. Lin, Q. Wu, L. Wu and Y. Que.** 2014. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cryIAC* transgenic sugarcane. *Scientific Reports*. **4**:4912.
59. **Picken, M. M., R. N. Picken, D. Han, Y. Cheng, and F. Strle.** 1996. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on Flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* . **15**(6):489–98.
60. **Sato, Y., T. Konishi, Y. Hashimoto, H. Takahashi, K. Nakaya, M. Fukunaga and M. Nakao.** 1997. Rapid diagnosis of lyme disease: Flagellin gene-based nested polymerase chain reaction for identification of causative *Borrelia* species. *International Journal of Infectious Diseases*. **2**(2):64–73.
61. **Parida, M., S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao and K. Morita.** 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. **18**:407-421.

Anexos

Anexo 1

Protocolo de extração de DNA por hidrólise alcalina com hidróxido de amónia

1. Ligar o bloco de aquecimento acertando a temperatura a 97°C, se existir outro bloco de aquecimento ligar e acertar a temperatura a 65°C;
2. Pipetar 600µl de Cultura para um tubo eppendorf *safe-lock* de 1,5 ou 2ml com e centrifugar a 14500rpm durante 10 minutos;
3. Descartar o sobrenadante e resuspender o sedimento em 600µl de hidróxido de amónia (Merck), diluição a 1:20 a partir do original a 20% para um frasco de vidro escuro;
4. Agitar no vortex para resuspender completamente o sedimento;
5. Colocar no termobloco a 97°C durante 20 minutos para lisar as bactérias, abrir a tampa e deixar mais 10 minutos;
6. Deixar arrefecer os tubos à temperatura ambiente e centrifugar a 14500rpm durante 5 minutos e descartar o sobrenadante;
7. Adicionar 700µl de etanol a 95% e 60µl de acetato de sódio a 3M, inverter os tubos algumas vezes para lavar o sedimento;
8. Deixar à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugar a 14500rpm durante 5 minutos;
9. Descartar o sobrenadante cuidadosamente adicionar resuspender suavemente em 1ml de etanol a 70% frio, invertendo os tubos algumas vezes;
10. Centrifugar o tubo a 14500rpm, durante 5 minutos;
11. Descartar o sobrenadante e deixar os tubos invertidos sobre papel absorvente durante 20 minutos;
12. Adicionar 55µl de tampão de eluição (TE) e colocar no termobloco a 65°C durante 10 minutos, para hidratar o DNA;
13. Preservar a 4°C no frigorífico.