



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Importância Epidemiológica dos Roedores como Reservatórios
de *Leptospira* spp. na Cidade de Bissau (Guiné- Bissau)
e áreas limítrofes**

Baltazar Cá

ABRIL, 2014



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Importância Epidemiológica dos Roedores Como Reservatórios
de *Leptospira* spp. na Cidade de Bissau (Guiné- Bissau)
e áreas limítrofes**

Autor: Baltazar Cá

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

Coorientador: Professor Doutor Jorge Seixas, Unidade de Ensino e Investigação de Clínica Tropical (UEICT), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE TROPICAL**

ABRIL, 2014

Dedico este trabalho

À memória do meu pai, Ocante Cá, dos meus tios, Cesário Almeida, e Jerónimo Almeida e dos meus avós Alexandre Almeida, Teresa Cá e Antónia Cá, por terem sido os alicerces da minha formação.

À Adile J. de Carvalho Pereira e Guilherme Gonçalo Pereira Cá, pela compreensão, pelo amor, carinho, presença incansável e pela compreensão das minhas longas ausências durante o período de elaboração deste trabalho.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenómenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

"Rui Barbosa"

Agradecimentos

Quero desta forma formular os meus agradecimentos a todos os que contribuíram de uma forma direta ou indireta para que este trabalho se tornasse uma realidade. Assim os meus agradecimentos vão especialmente para:

A investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, orientadora desta dissertação, pela forma tão esclarecida e entusiástica que teve na transmissão dos ensinamentos, pela paciência que demonstrou para comigo ao longo de todo o período em que decorreu a elaboração, revisão do texto e o arranjo final da dissertação, quero manifestar a minha profunda gratidão, pela oportunidade em trabalhar neste tema sob a sua orientação. Tudo que aqui exprimo é de longe insuficiente para descrever a minha gratidão.

Ao professor Doutor Jorge Seixas, coorientador deste trabalho, e que esteve na génese deste, quero reiterar o meu profundo agradecimento pela forma como me acolheu ao longo destes dois anos no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Aproveito ainda para agradecer todo o precioso tempo de que prescindiu para responder as minhas inúmeras questões, com as suas críticas, correções, ensinamentos e sugestões, mas sobretudo a sua amizade, sem dúvida imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Mestre Teresa Carreira, Técnica Superior da Unidade de Microbiologia Médica afeta ao Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme, do IHMT, Universidade Nova de Lisboa (UNL) por toda ajuda prestada e pela disponibilidade. O seu apoio no laboratório foi fundamental do princípio ao fim deste trabalho.

Às Mestres Mónica Nunes e Elsa Fortes, pelo companheirismo e pronta resposta as minhas dúvidas.

À Funcionária Céu Mateus assistente operacional do IHMT-UNL, pelo apoio no decurso do presente trabalho, e aos restantes colegas, Elsa Graciano e Nádia Lopes.

A Doutora Dinora Lopes assim como a toda a equipa do Biotério do IHMT, pelos conhecimentos transmitidos e apoio relativamente à parte prática do correto manuseio e necropsias dos roedores.

Ao Projeto de Saúde de Bandim (Guiné Bissau) na pessoa da Dr.^a Amabélia Rodrigues pela ajuda e disponibilidade prestada na conservação das amostras.

A toda a equipa do comité nacional de ética em saúde da Guiné-Bissau, e muito particularmente ao seu presidente e Dr. Cunhaté na Bagna, e ao Dr.Djico pelos incentivos e encorajamentos.

Ao Instituto Nacional de Saúde Publica da Guiné-Bissau, na pessoa do seu Presidente, Dr. Zacarias da Silva, pela amabilidade com que me recebeu e pela abertura e disponibilidade com que me facilitou o acesso ao Laboratório Nacional de Saúde Publica.

A associação de comerciantes e retalhistas do mercado de Caracol em Bissau, através dos seus guardas noturnos que me ajudaram na captura dos roedores.

A todos os meus colegas do Mestrado especialmente ao Dr. António Monteiro (Dimi) pela preciosa ajuda durante o ano curricular, aos meus amigos (as) que me ajudaram no trabalho de campo, nomeadamente o Sr. Armando Ié, o Sr. Bubacar, a Sra. Mária A. Monteiro Djaló.

Finalmente as minhas últimas palavras vão para minha família pelo incentivo e pelo incondicional apoio.

A todos

Um muito obrigado...

Resumo

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, causada por espiroquetídeos do género *Leptospira*, com implicações na Medicina Veterinária e Humana (*One Health*) e impacte significativo na Saúde Pública e na Economia Pecuária.

Embora de reconhecida importância em zonas tropicais, pouco se sabe sobre a leptospirose em África. Na Guiné-Bissau existem apenas dois estudos de seroprevalência em humanos, datados das décadas de 50 e 80 do século XX, que indicam a existência da doença.

Os roedores, em particular os murinos (géneros *Rattus* e *Mus*, entre outros), constituem os principais reservatórios da bactéria, a partir dos quais as leptospirosas são transmitidas aos humanos e/ou a outros animais. A inespecificidade das manifestações clínicas da leptospirose nos humanos leva a que esta seja facilmente confundida com malária, septicemia, hepatite viral, dengue, ou outras doenças que cursam com síndrome febril, pelo que o doente deixa assim de receber o tratamento adequado e em tempo útil.

Para o conhecimento da epidemiologia da leptospirose, em qualquer região e/ou país, são indispensáveis a identificação dos serovares mais prevalentes e a caracterização dos respetivos reservatórios/hospedeiros. Estes conhecimentos são críticos para a implementação de medidas de controlo eficazes da doença.

O presente estudo teve como objetivo contribuir para um melhor conhecimento da importância epidemiológica e ecológica dos roedores e o seu papel como reservatório de *Leptospira* spp. na cidade de Bissau e áreas limítrofes, pela determinação da taxa da prevalência bacteriológica de *Leptospira* spp. na população de roedores capturados.

Entre Maio e Agosto de 2013 foram capturados 104 roedores em sete (7) bairros da cidade de Bissau. Procedeu-se à necropsia dos roedores e os rins foram colhidos e conservados para posterior análise no Instituto de Higiene de Medicina Tropical em Lisboa.

Foi determinada a taxa de infeção bacteriológica pela deteção e identificação de DNA leptospírico com recurso a técnicas moleculares (PCR e sequenciação). Foram utilizados dois protocolos, ambos com *primers* específicos para leptospirosas patogénicas,

um PCR convencional com *primers* baseados no gene *hap1* e o outro, um *nested*-PCR com *primers* obtidos do gene *lipL32*. Em 10% das amostras tentou-se ainda o método de cultura para obtenção de isolados de *Leptospira*.

Os roedores foram identificados como pertencentes às espécies *Rattus norvegicus* (63,5%), *Mus musculus* (34.6%) e *Rattus rattus* (1.9%).

Trinta dos 104 roedores capturados (29%) mostraram presença de DNA leptospírico, sendo que (20/30; 67%) pertenciam à espécie *R. norvegicus*, (9/30; 30%) à espécie *M. musculus* e (1/30; 3%), pertencia à espécie *R. rattus*. Foram sequenciadas 12 das 30 amostras positivas, cuja análise por BLAST, permitiu a identificação dos serovares Icterohaemorrhagiae e Pomona, pertencentes respetivamente às genoespécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, ambas reconhecidamente de elevada patogenicidade para os humanos. Não houve até à data crescimento bacteriano nas sementeiras efetuadas.

Em conclusão, este trabalho permitiu, pela primeira vez, identificar leptospiros patogénicas em roedores na cidade de Bissau, pelo que teve um carácter pioneiro na determinação do papel destes mamíferos silváticos como reservatórios de leptospiros na Guiné-Bissau.

Os resultados obtidos justificam a realização de estudos adicionais e mais exaustivos de investigação epidemiológica sobre esta zoonose em Bissau e no território nacional. Os ganhos para a Saúde Humana e Veterinária no país poderiam ser significativos, nomeadamente em termos do benefício no acompanhamento clínico dos doentes com leptospirose e na implementação de medidas adequadas para o controlo desta zoonose.

Palavras-chave: Guiné-Bissau; Roedores; PCR; *lipL32*; *hap1*; *Leptospira* spp.

Abstract

Leptospirosis is a worldwide important zoonosis, caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, with implications in Human and Veterinary Medicine (One Health) and a significant impact in Public Health and livestock economics.

Although its importance is recognized in tropical regions, little is known about leptospirosis in Africa. In Guiné-Bissau, only two seroprevalence studies in humans dating from the 50's and 80's of the 20th century are available, that indicates the existence of the disease.

Rodents, in particular the murine (genera *Rattus* and *Mus*, among others) are the main reservoirs of the bacteria. From them *Leptospira* is transmitted to humans and/or to other animals. The inespecificity of the clinical features of leptospirosis in humans implicates that the disease is easily misdiagnosed for malaria, septicemia, viral hepatitis, dengue or other diseases presenting as a febrile syndrome. The correct treatment is thus not instituted.

In any given region or country, the identification of the most prevalent serovars and the characterization of the corresponding reservoirs/host are paramount for the knowledge on the epidemiology of the disease. This knowledge is critical for the implementation of efficient control measures.

The objective of the present study was to contribute to a better epidemiological and ecological knowledge on the importance and role of rodents as *Leptospira* spp. reservoirs in the city of Bissau and surroundings, by determining the bacteriological prevalence rate of *Leptospira* spp. in the studied rodent population.

Between May and August 2013, 104 rodents were captured in seven (7) neighborhoods of Bissau city. Necropsy was performed and rodent kidneys were collected and preserved for subsequent studies in Lisbon, at the Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

The bacteriological infection rate was determined using molecular techniques (PCR) for leptospiral DNA detection. Two PCR protocols both specific for pathogenic *Leptospira* were used: a conventional PCR with primers based on *hap1* gene and another one, a

nested PCR with primers obtained of *lipL32* gene. In 10% of the samples the cultural method was also attempted in order to obtain *Leptospira* isolates.

Rodents were identified as belonging to the species *Rattus norvegicus* (63.5%), *Mus musculus* (34.6%) and *Rattus rattus* (1.9%).

Thirty of the captured rodents (29%) were found to be PCR positive: (20/30; 67%) belonging to the *R. norvegicus* species, (9/30; 30%) to the *M. musculus* species and (1/30; 3%) belongs to the *R. rattus* species.

Twelve out of thirty positive samples were sequenced and BLAST was employed subsequently, allowing the identification of the Icterohaemorrhagiae and Pomona serovars which belong to *L. interrogans* e *L. kirschneri* genospecies respectively, both recognized as highly pathogenic for humans. So far, no growth was observed in the culture medium.

In conclusion, this work was able to identify, for the first time, the presence of pathogenic leptospires in rodents from Bissau, thus breaking new ground in the determination of the role of these sylvatic mammals as reservoirs of these bacteria in Guinea-Bissau.

The results shown indicate the need for additional and more extensive epidemiological research on this zoonosis in Bissau and in the national territory. The benefits for Human and Veterinary Health in Guinea-Bissau could be considerable, namely in terms of a better patient management and the implementation of adequate control measures for this zoonosis.

Keywords: Guiné-Bissau; Rodents; PCR; *lipL32*; *hap1*; *Leptospira* spp.

Índice Geral

Dedicatória e Agradecimentos	iii
Resumo	vii
<i>Abstract</i>	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas e siglas	xvii

PARTE I - Estado da Arte

1. Leptospirose e leptospiras	3
1.1 Definição e História	3
1.2 A Biologia do agente etiológico - <i>Leptospira</i> spp	4
1.3 Taxonomia e classificação	5
1.3.1 Classificação convencional (fenotípica)	5
1.3.2 Classificação molecular (genotípica)	6
2. Epidemiologia da Leptospirose	7
2.1 Ciclo de transmissão das leptospiras.....	7
2.2 Leptospirose no mundo	9
2.3 Leptospirose em África	9
3. Patogénese	10
4. Diagnóstico Laboratorial	11
4.1 Métodos Diretos	11
4.1.4 Microscopia de fundo escuro	11
4.1.2 Cultura	12

4.1.3 Amplificação de DNA (PCR)	12
4.2 Métodos Indiretos	13
4.2.1 Teste de aglutinação macroscópica -Técnica de rastreio	13
4.2.2 Teste ELISA - Técnica de rastreio	13
4.2.3 Teste de aglutinação microscópica (TAM) - Técnica de referência	14
5. Roedores-reservatórios naturais de <i>Leptospira</i> spp	15
5.1 <i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhaut, 1769) - rato castanho	15
5.2 <i>Rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758) - rato preto	16
5.3 <i>Mus musculus</i> (Linnaeus, 1758) - rato caseiro	17
6. Prevenção e controlo de roedores	17
7. Prevenção e controlo da Leptospirose	20
 PARTE II - <i>Leptospira</i> spp na Guiné-Bissau	
1. Introdução	25
2. Justificação do tema	27
3. Objetivos do estudo	28
3.1 Objetivo geral	28
3.1.1. Objetivos específicos	28
4. Material e Métodos	29
4.1 Caracterização da área de estudo	29
4.2 Trabalho de campo - Roedores	30
4.2.1 Estratégia de amostragem e determinação de zonas de captura	30
4.2.2 Tipos de armadilhas	31
4.3 Captura de roedores	32
4.4 Laboratório - roedores (Guiné-Bissau)	33
4.4.1 Identificação e registo de dados morfométricos dos roedores	33
4.4.2 Necropsia dos roedores	33
4.4.3 Acondicionamento, conservação e transporte das amostras	34

5. Laboratório - Roedores - Detecção e Identificação de <i>Leptospira</i> spp	35
5.1 Abordagem molecular	35
5.1.1 Extração e purificação de DNA	35
5.1.2 Testes de especificidade e de sensibilidade dos <i>primers</i>	35
5.1.3 PCR com os <i>primers</i> - “hap 1”	36
5.1.4 <i>Nested-PCR</i> com <i>primers</i> ‘lipL32’	37
5.1.5 Sequenciação de DNA de <i>Leptospira</i> spp	39
5.2 Cultura de tecido renal em meio de EMJH	39
5.3 Tratamento e análise de dados	39
6. Resultados	40
6.1 Caracterização da amostra	40
6.2 Testes moleculares	44
6.2.1 Teste de especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> “hap1”	44
6.2.2 Teste de especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> “LipL32”	46
6.2.3 Amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp com os <i>primers</i> “hap1” e “LipL32”	46
6.2.3 Cultura	51
6.2.4 Sequenciação de produtos amplificados (DNA leptospírico)	52
7. Discussão e Conclusões	53
8. Referências Bibliográficas	62
Anexos	
Anexo I - Declaração do comité nacional de ética em saúde da Guiné-Bissau	71
Anexo II - Ficha de recolha de dados	73
Anexo III - Protocolo de necropsia	76
Anexo IV - Preparação do meio de cultura EMJH	77
Anexo V - Protocolo para as culturas de rim	79

Anexo VI - Extração e purificação de DNA (Citogene [®] Tissue Kit)	80
Anexo VII - Mapa de bairros em estudo na Cidade de Bissau.....	83
Anexo VIII - Trabalho de campo - Registo fotográfico.....	85

Índice de Figuras

Figura I.1. Microfotografias de <i>Leptospira</i> spp. A - imagem em mic. eletrónica B	4
Figura I.2. Ciclo de transmissão das leptospiros	8
Figura I.3. Controlo integrado de roedores.....	18
Figura II.1. A - Localização geográfica da Guiné-Bissau; B - Cidade de Bissau	30
Figura II.2. Imagens de dois locais onde se realizaram as capturas dos roedores (Armazém e Mercado)	31
Figura II.3. Exemplo das armadilhas utilizadas para captura de roedores	31
Figura II.4. Transporte dos roedores capturados.....	32
Figura II.5. Registo de dados morfométricos dos roedores.....	33
Figura II.6. Necropsia de roedores.....	34
Figura II.7. Caixa térmica e acumuladores de gelo.....	34
Figura II.8. Preparação e corte do rim para extração de DNA leptospírico	35
Figura II.9. Exemplos representativos de roedores das três espécies capturadas	41
Figura II.10. Representação gráfica da distribuição da amostra de roedores capturados.....	42
Figura II.11. Distribuição de roedores por espécie, género e estágio de desenvolvimento.	42
Figura II.12. Distribuição percentual do total de roedores capturados por bairro.	43
Figura II.13. Distribuição de roedores por habitat de captura	44
Figura II.14. Resultado do teste de especificidade com os <i>primers</i> “hap1”	45
Figura II.15. Resultado do teste de sensibilidade da PCR com <i>primers</i> “hap1”	46
Figura II.16. Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os <i>primers</i> “hap1”	47
Figura II.17. Exemplo da amplificação de DNA leptospírico com os <i>primers</i> “lipL32”	48
Figura II.18. Representação gráfica da distribuição de roedores <i>versus</i> presença de DNA de acordo com a espécie.....	48
Figura II.19. Representação gráfica da distribuição de roedores <i>versus</i> presença de DNA por espécie e género (♂ e ♀).....	49

Figura II.20. Percentagem de roedores nas instalações (interiores e exteriores)..	49
Figura II.21. Distribuição das amostras (roedores) em que foi detetado DNA de <i>Leptospira</i> spp. versus género (♂ e ♀) e habitat.....	50
Figura II.22. Distribuição dos roedores com PCR positivo de acordo com o bairro onde foram capturados.	51
Figura II.23. Exemplo da identificação de uma das sequências obtidas, correspondendo à espécie <i>L. interrogans</i> (serovar Icterohaemorrhagiae).....	52

Índice de tabelas

Tabela I.1. Classificação das genoespécies do género <i>Leptospira</i>	6
Tabela II.1. Bairros em estudo e as suas respetivas áreas em km ²	30
Tabela II.2. Sequências dos <i>primers</i> designados “hap 1”, utilizados	36
Tabela II.3. Condições ótimas de PCR com os <i>primers</i> “hap 1”	37
Tabela II.4. Sequências dos <i>primers</i> ‘lipL32’ utilizados	38
Tabela II.5. Condições ótimas da (1 ^a e 2 ^a amplificação) com <i>primers</i> “lipL32”	38
Tabela II.6. Resumo das principais caraterísticas dos roedores capturados	40
Tabela II.7. Distribuição do total de roedores capturados por bairro e por espécie	43
Tabela II.8. Resumo resultados obtidos pela PCR (dois protocolos) de acordo com <i>a</i> espécie e género (♂ e ♀) <i>versus</i> o total da amostra (N=104)	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS

BLAST	<i>Basic local Alignment Search Tool</i>
CN	Controlo Negativo
C+	Controlo positivo
Cext	Controlo de extração
DNA	<i>Dexoribonucleic acid</i> (Ácido desorribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleótido-trisfosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	<i>Ellinghausen, McCoullough & Johnson Haris</i>
Ex	Exemplo
<i>et al</i>	e colaboradores
Fig.	Figura
g	Gramma
G	Guanina
<i>hap1</i>	<i>hemolysis-associated protein 1</i> (gene que codifica a proteína associada à hemólise)
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
INASA	Instituto Nacional de Saúde
IHMT/UNL	Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa
<i>lipL32</i>	Gene que codifica a lipoproteína 32
L&BL	Laboratório de Leptospirose & Borreliose de Lyme
LNSP	Laboratório Nacional de Saúde Pública (Guiné-Bissau)
LPS	Lipopolissacáridos
MACRO	Técnica de Aglutinação Macroscópica
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i>
µg	micrograma

μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	milimolar
mL	mililitro
min	minuto
Mmol	Milimolar
NH₄	Amónia
nM	nanomolar
NH₄ 2SO₄	Sulfato de Amónia
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P	(p-value) (nível de significância)
PNDS II	Plano Nacional do Desenvolvimento Sanitário II
pH	potencial de Hidrogénio
pM	picomolar
pmol	picomoles
rpm	rotações por minuto
s.l.	sensu lato
spp	espécies
Tris-HCl	Tris (hidroximetilo) aminometano - ácido clorídrico
U	Unidade
ULBL	Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme (atual Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme)
V	Volts
χ²	Qui-quadrado
WHO / ILS	World Health Organization / International Leptospirosis Society

..

PARTE I

ESTADO DA ARTE

1 Leptospirose e Leptospiras

1.1 Definição e História

A leptospirose é uma doença bacteriana, causada por bactérias do género *Leptospira*. É considerada a zoonose de maior preocupação em todo mundo (Levett 2001; WHO 2003). Apresenta uma vasta distribuição geográfica, estando particularmente presente nos países de clima tropical e subtropical, especialmente nos países da América Latina e no sudoeste Asiático (Picardeau, 2013).

Nos humanos, o espectro clínico da doença é muito amplo, e pode evoluir de uma infecção subclínica a uma síndrome com o envolvimento de diversos órgãos e sistemas, sendo que as manifestações clínicas como febre, mialgias, cefaleias, insuficiência renal aguda, hepática e/ou pulmonar, podem evoluir para, um desfecho fatal se não forem tratadas atempadamente. Também nos animais, as manifestações clínicas são significativas, em particular nos bovinos, a leptospirose é responsável por abortos, e perdas na lactação, levando a significativas perdas económicas na agropecuária (Levett, 2001).

A síndrome ictérica com falência renal foi primeiramente descrita há mais de 100 anos por Adolf Weil, em Heidelberg. No ano de 1887, a doença foi denominada, por Goldschmidt, como síndrome de Weil, considerada a forma mais grave da leptospirose humana. (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Depois, em 1915, foi demonstrada a etiologia da leptospirose, por uma equipa de médicos Japoneses, Inada e Ido, que isolaram a bactéria a partir de um cobaio infetado com sangue de um doente sofrendo de doença de Weil. Simultaneamente e de forma independente, duas equipas alemãs confirmaram a etiologia da doença na Europa, analisando amostras de sangue de soldados alemães sofrendo da então designada “doença francesa das trincheiras” do nordeste de França. Foram inoculados cobaios com o sangue daqueles soldados, tendo sido detetadas espiroquetas que foram designadas como *Spirochaeta nodosa* e *Spirochaeta icterogenes*, nomes que vieram a tornar-se sinónimos de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Vieira, 2006).

O papel dos roedores como principal fonte de infecção para os humanos foi reconhecido em 1917, sendo que, desde então, a presença destes animais, especialmente da ratazana (*Rattus norvegicus*), passou a ser relacionada com algumas atividades humanas, de forma que a infecção humana, resulta em regra, da exposição accidental, direta ou indireta (e.g. através da água, solo e vegetação contaminados) com urina de animais reservatórios/hospedeiros naturais das leptospiros, em particular dos roedores (Levett, 2001). Em países desenvolvidos a leptospirose é considerada uma doença reemergente (Levett 2001), que além de afetar indivíduos cujas profissões constituem risco elevado de exposição às leptospiros, o que constitui o designado risco ocupacional, está também relacionada com atividades de lazer e desporto, sobretudo em coleções de água doce, como a canoagem, o *rafting*, o ecoturismo, triatlo ou até golfe (Levett, 2001).

1.2 A Biologia do agente etiológico - *Leptospira* spp.

As leptospiros são espiroquetas aeróbias obrigatórias, helicoidais, flexíveis e móveis fortemente espiraladas, geralmente apresentam 0,1µm de diâmetro, com 6-20 µm de comprimento e têm as extremidades encurvadas em forma de gancho (**Fig. I.1**). Possuem dois filamentos axiais, com inserções polares que estão localizados no espaço periplasmático (Faine *et al.*, 1999) e também uma membrana dupla, típica e comum às outras espiroquetas, em que a membrana citoplasmática e a parede celular, constituída por peptidoglicano, estão proximamente associadas e são envolvidas pela membrana externa (Levett, 2001).

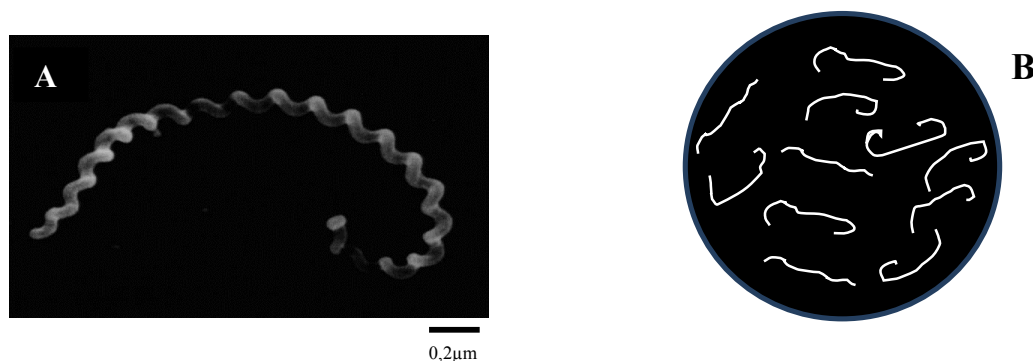


Figura I.1. Microfotografias de *Leptospira* spp. **A** - imagem eletrónica (*adaptado de Faine et al.*, 1999). **B** - representação esquemática de leptospiros em microscopia de fundo escuro (*foto original do autor*).

A temperatura ótima de crescimento situa-se entre os 28° e os 30°C, com um tempo de geração de aproximadamente 12 horas. Crescem em meios enriquecidos com vitaminas principalmente B₂ e B₁₂ (Faine *et al.*, 1999), tendo como fonte de energia ácidos gordos de cadeia longa. As leptospiros conseguem sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo, sendo para isso necessário que o pH se situe entre 7,2 a 7,4.

1.3 Taxonomia e Classificação

As leptospiros pertencem ao domínio das bactérias, ordem Spirochaetales a qual inclui duas famílias: Spirochaetaceae que inclui os dois outros géneros de espiroquetas com importância médica (*Treponema* e *Borrelia*) e Leptospiraceae a família a que pertence o género *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999). O género *Leptospira* é constituído, por sua vez, por duas espécies: *Leptospira interrogans* que inclui todas as leptospiros patogénicas e *Leptospira biflexa*, que inclui todas as saprófitas isoladas no ambiente.

Atualmente coexistem dois sistemas de classificação: o sistema antigénico ou convencional e o sistema genómico ou molecular.

1.3.1. Classificação convencional (fenotípica)

A unidade sistemática da classificação das leptospiros é o serovar, cujo estatuto é determinado com base nas semelhanças e diferenças antigénicas e, mais recentemente, moleculares, do género *Leptospira*, começando por agrupar as leptospiros patogénicas para os humanos e animais numa espécie única *L. interrogans* com cerca de 260 serovares organizados em 25 serogrupos, sendo as restantes incluídas na espécie *L. biflexa* que conta com 60 serovares organizados em 38 serogrupos, a qual inclui as leptospiros saprófitas de águas superficiais e do solo (Levett & Smythe, 2008). Nesta classificação, além dos critérios de patogenicidade, as espécies do género *Leptospira* distinguem-se ainda por outros critérios. Assim, as bactérias pertencentes à espécie tradicional *L. interrogans*, quando colocadas, durante duas horas, numa solução de NaCl (1M) e à temperatura de 20-30°C, adquirem forma esférica, não demonstram crescimento a 13°C bem como na presença de 8-azaguanina (225µl/ml), características não partilhadas pelas estirpes saprófitas (*L. biflexa*) pois não adquirem a forma esférica

na presença da referida solução salina, crescem em meio de cultura com 8-azaguanina (225µl/ml) e à temperatura de 13°C (Johnson & Rogers, 1964; Vieira, 2006).

1.3.2. Classificação molecular (genotípica)

As técnicas moleculares têm permitido um grande avanço para a ciência particularmente para a microbiologia. A introdução de técnicas de biologia molecular revolucionou os métodos de classificação e consequentemente a taxonomia das leptospiros, com a necessária adaptação de uma abordagem semelhante (**Tabela I.1**).

Tabela I.1. Classificação das genoespécies do género *Leptospira*
(adaptado de Picardeau, 2013)

Espécie	Serogrupo	Serovar	Estirpe
Patogénicas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz L1-130
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Mozdok	5621
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermédias			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomi</i>	Undesignated	ND	5399
Saprófitas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Samaranga	Samaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Samaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Samaranga	Saopaulo	São Paulo

No caso do sistema molecular a unidade básica é a espécie genómica que por definição apresenta um grau de homologia em hibridação DNA-DNA igual ou superior a 70% e menos de 5% de divergência entre temperaturas de fusão dos híbridos (Yasuda *et al.*, 1987). Atualmente, já foram identificadas 20 espécies genómicas (genoespécies), dentro do género *Leptospira*, das quais nove são patogénicas (com estirpes isoladas de humanos e animais) e seis são saprófitas (isoladas do ambiente) e ainda cinco espécies “intermédias” que são distintas das leptospiros patogénicas e saprófitas, de acordo com a sua sequência da subunidade 16S de RNA, para as quais a virulência ainda não foi demonstrada experimentalmente (Picardeau, 2013), mas que se sabe partilham parcialmente características das patogénicas e das saprófitas.

2 Epidemiologia da Leptospirose

2.1 Ciclo de transmissão das leptospiros

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leptospirose como a zoonose de maior difusão em todo mundo (WHO, 2003). A infeção humana pelas leptospiros resulta da exposição direta ou indireta a urina de animais, que contenha leptospiros viáveis, ou através do solo e águas superficiais. As taxas de incidência são mais significativas em países ou regiões de clima tropical do que em regiões de clima temperado (Levett, 2001; Pappas *et al.*, 2008).

A transmissão de pessoa a pessoa é rara e de pouca importância prática (Adler & Moctezuma, 2009). A penetração da bactéria no organismo ocorre através da pele lesada ou das mucosas da boca, narinas e olhos, podendo também ocorrer através da pele íntegra, quando imersa em água por longo tempo (Levett, 2001).

As leptospiros têm nos mamíferos silváticos, em particular nos roedores, os principais hospedeiros ou reservatórios de manutenção, sendo que sobrevivem à infeção por mecanismos de tolerância imunitária, tornando-se assintomáticos e eliminando as leptospiros alojados nos túbulos renais, durante toda a vida. Este facto associado a elevada capacidade de proliferação dos roedores, bem como à coabitação em ambiente doméstico e peri-doméstico, faz com que estes animais desempenhem um papel

fundamental na dispersão das referidas bactérias na natureza (Adler & Moctezuma, 2009).

A transmissão de leptospiros entre animais domésticos e silváticos pode ocorrer por via genital e alimentar e no caso de gestação, através da placenta. A via mais importante é a alimentar através do contacto ou ingestão de água e alimentos contaminados com urina de animais infetados, em particular dos portadores crónicos (**Fig. I.2**), (Faine *et al.*, 1999).

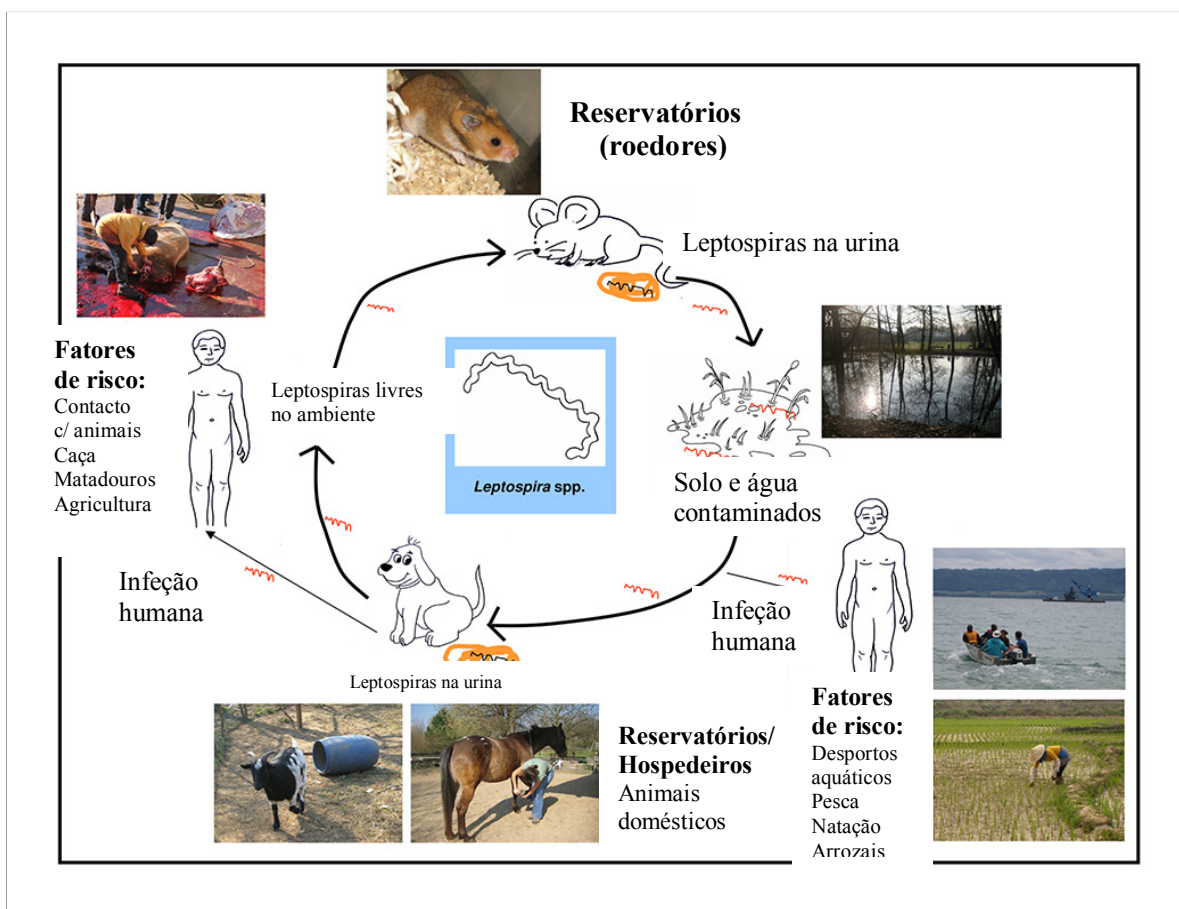


Figura I.2. Ciclo de transmissão das leptospiros.

2.2 Leptospirose no mundo

Desconhece-se a real prevalência dos casos da leptospirose a nível mundial, devido às dificuldades ligadas á subnotificação dos casos, mas calcula-se que a sua incidência se situe entre 0,1 a 1/100,000 hab/ano nas zonas temperada e entre 10 a 100/100.000 hab/ano no decurso de epidemias nos trópicos, sendo que a OMS já em 2003, apontava para 300.000 a 500.000 casos/ano (WHO, 2003). A elevada incidência nos trópicos, é justificada pelo longo tempo de sobrevivência das leptospirosas em condições ideais, contribuindo para isso a temperatura e a humidade favoráveis, a existência de águas superficiais, decorrente da época de chuvas, e as deficientes condições de saneamento (Pappas *et al.*, 2008).

2.3 Leptospirose em África

Em África, embora as condições ambientais e climáticas sejam propícias para a proliferação das leptospirosas devido ao carácter rural, da grande maioria destes países com aglomerados populacionais localizadas junto a cursos de água, sem saneamento básico, e com condições de higiene precárias, o que favorece a proliferação dos roedores, pouco se conhece sobre esta doença em África (Geoffrey & Coleman, 2008; Granjon & Duplantier, 2009). No entanto, existem registos de pequenos surtos que provam a sua existência, mostrando também quanto a doença é subdiagnosticada e por consequência tem sido subavaliada (WHO, 2003).

Ultimamente, alguns estudos pontuais conduzidos em Angola (Garcia, 2011; Fortes-Gabriel, 2013; Ndeyanelao, 2013), em Botswana (Jobbins *et al.*, 2013), no Egipto (Felt *et al.*, 2011) na Etiópia e no Gabão (Bertherat *et al.*, 1999), em Madagáscar (Rahelinirina *et al.*, 2010), na Nigéria (Ngbede *et al.*, 2012), no Quênia (Halliday *et al.*, 2013), e na Tanzânia (Mgode *et al.*, 2006), têm evidenciado claramente a importância crescente desta zoonose, associada à frequente deteção de anticorpos anti-*L. interrogans* nas populações e/ou mesmo ao isolamento da bactéria, nos principais reservatórios (roedores) e nos hospedeiros, em particular nos humanos.

3 Patogénese

Embora conhecidos há mais de um século, os mecanismos pelos quais as leptospiros causam doença, estão ainda por esclarecer os fatores implicados na mesma. (Plank & Dean, 2000).

Existe um conjunto de fatores de virulência, tais como a produção de toxinas pelas leptospiros patogénicas, proteínas de superfície que são muito imunogénicas e até os lipopolissacáridos (LPS), que são responsáveis pela especificidade do serovar, entre outros aspetos que, globalmente, contribuem para a infeção pelas várias espécies patogénicas de *Leptospira* (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Como referido anteriormente, as leptospiros após penetrarem no hospedeiro e atingirem a corrente sanguínea multiplicam-se rapidamente, dando origem à chamada fase (septicémica ou leptospirémica, a qual pode durar de um sete dias. Durante este período ocorre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas inespecíficos, como a febre, dores de cabeça e musculares (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003; Adler & Moctezuma, 2009).

A resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro faz com que as leptospiros sejam removidas da circulação, tecidos e órgãos por fagocitose e opsonização, coincidindo com o aparecimento de anticorpos circulantes (IgM) e recrudescência de sintomas. Esta fase é assim designada por fase imune, também conhecida por fase de leptospirúria, pois corresponde ao período de eliminação das leptospiros pela urina (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Porém, quando a primeira resposta imunológica não é suficiente para deter o progresso das leptospiros, estas avançam nos tecidos e aí multiplicam-se rapidamente, prolongando o período de incubação que poderá chegara 30 dias, e voltam a surgir os sinais e sintomas iniciais. Assim, as complicações da leptospirose surgem geralmente, na segunda semana da doença, devido à localização das leptospiros nos tecidos (Vieira, 2006).

4 Diagnóstico Laboratorial

O recurso ao diagnóstico laboratorial, para confirmação dos casos de leptospirose humana é obrigatório e resulta da acentuada inespecificidade do respetivo quadro clínico e da diversidade de sintomas (Vieira, 2006).

O diagnóstico laboratorial para a leptospirose baseia-se principalmente em métodos diretos (microscopia, cultura e ultimamente, em técnicas de biologia molecular para a deteção do DNA leptospírico (tecnologia de PCR), e em métodos indiretos para a deteção de anticorpos específicos, Teste de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto e outros) e ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent-Assay*) que são testes de rastreio, e o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) que é a técnica de referência preconizada, ainda hoje, pela OMS (WHO, 2003).

Convém salientar no entanto, que a seleção do(s) método(s) a utilizar depende, fundamentalmente da fase de evolução da doença, em virtude dos múltiplos fenómenos envolvidos no decurso da infeção leptospírica. Assim, durante a primeira semana da doença (fase leptospirémica) devem-se pesquisar as bactérias no sangue, e/ou no líquido [líquido céfalo raquidiano (LCR)] por métodos diretos, enquanto que a pesquisa de anticorpos só deverá ter lugar a partir da segunda semana da doença, período em que geralmente surgem no sangue (soro), em níveis detetáveis pelas provas utilizadas no imunodiagnóstico de rotina. Com o aparecimento dos primeiros anticorpos, as leptospirosas tendem a desaparecer da circulação sanguínea e vão alojar-se nos rins, aumentando por esse motivo, a sua eliminação pela urina, durante a fase de leptospirúria, o que na infeção humana dura cerca de um mês. Neste período, as bactérias devem assim, ser pesquisadas na urina por meio de exame direto (Levett; 2001; WHO 2003; Picardeau, 2013).

4.1 Métodos Diretos

4.1.1. Microscopia convencional e de fundo escuro

Existem várias técnicas de microscopia utilizadas para identificação das leptospirosas (fluorescência, microscopia de preparações impregnadas pela prata, microscopia convencional em campo claro mas apenas quando as preparações são coradas pelo

vermelho de congo, entre outras). No entanto, a mais comum é a microscopia de fundo escuro. Em caso positivo, isto é, quando as leptospiras estão presentes, estas identificam-se pela sua forma e motilidade muito características. Porém, esta técnica tem algumas limitações, devendo ser realizada por pessoal especializado e experiente, e o material deve estar livre de artefactos, detritos ou restos celulares que possam prejudicar a observação do campo escuro microscópico, e, consequentemente interferir com a interpretação inequívoca do material biológico (Collares-Pereira, 1994; WHO 2003; Vieira, 2006). É, mesmo assim, uma técnica com sensibilidade e especificidade baixas, requerendo microrganismos intactos e viáveis.

4.1.2. Cultura

A cultura é o método ideal para isolar leptospiras, assegurando posteriormente a identificação da(s) espécie(s) por recurso a metodologias serológicas e/ou moleculares. A cultura permite estabelecer o diagnóstico definitivo, da infeção e fornece adicionalmente dados epidemiológicos de interesse local, através do reconhecimento de serovares patogénicos, dos novos padrões de manifestação clínica, das fontes de contágio e mesmo da eficácia das medidas de controlo (WHO, 2003).

Por não permitir uma resposta rápida não é normalmente utilizada no diagnóstico de rotina onde se exige uma resposta célere. Além disso, a eficácia deste meio de diagnóstico depende muito da ausência de resíduos de antibióticos, de reduzida autólise tecidular e de condições ótimas de conservação do material a cultivar, após a colheita.

É bom salientar aqui, a importância desta metodologia para estudos epidemiológicos ao nível dos reservatórios (roedores) e ainda em estudos *post-mortem* em humanos (Vieira, 2006).

4.1.3. Amplificação de DNA leptospírico por PCR

A técnica de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) tem adquirido preponderância nos últimos anos, sendo usada para amplificar o DNA leptospírico no sangue, soro, urina, líquido e nos tecidos (renal, hepático, pulmonar, entre outros). A técnica apresenta algumas vantagens nomeadamente em situações de: i)

atraso ou ausência de resposta humoral isto é, permite detetar DNA leptospírico numa fase precoce da doença, sobretudo em casos de silêncio imunológico (Vieira, 2006); *ii*) desfecho fatal precoce, e *iii*) surtos epidémicos em que a identificação rápida do agente causal possibilita uma atuação mais eficaz no tratamento da doença e no controlo da(s) respetiva(s) fonte(s) de infeção,

4.2 Métodos indiretos

4.2.1. Teste de Aglutinação Macroscópica (MACROLepto e outros) - Técnica de rastreio

Também conhecido por teste de Macroaglutinação em lâmina o teste de aglutinação Macroscópica (MACROLepto entre outros testes, entre os quais os de manufatura comercial, é uma técnica utilizada para rastreio laboratorial. Consiste na utilização de uma suspensão antigénica simples (com um único antigénio) ou mais complexa (incluindo vários antigénios), representativos do(s) serovar(es) mais prevalentes numa determinada região ou País, o que contribui para o aumento da respetiva sensibilidade. A sua especificidade é relativamente baixa, na medida em que pode produzir resultados duvidosos devido a reações cruzadas com outras doenças,

O seu uso é apenas indicado quatro a cinco dias após o início dos sintomas, aquando da formação dos primeiros anticorpos específicos.

Esta técnica é vantajosa para zonas onde não existe suporte laboratorial especializado (uma vez que não exige antigénios vivos), sendo também de execução rápida e fácil (Gonçalves, 2009).

4.2.2. Teste ELISA – Técnica de rastreio

O teste ELISA é também considerado um teste de rastreio. Utiliza um antigénio leptospírico a revestir as placas de microaglutinação. O soro a estudar é colocado em contacto com o antigénio seguindo-se a respetiva incubação e lavagem. A reação inicial antigénio-anticorpo vai ser evidenciada pela utilização de um conjugado marcado com uma enzima da reação colorimétrica, e o respetivo substrato cromogénico. A

intensidade da reação colorimétrica é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra (Vieira, 2006; WHO, 2003). Permite distinguir anticorpos específicos IgM e IgG e facilita o estudo de um grande número de amostras com menos custo em tempo e reagentes comparativamente com a técnica de referência (Teste de Aglutinação Microscópica, TAM) de que se falará a seguir.

Embora com algumas vantagens, o teste ELISA é apenas específico para o género não determinando o serogrupo infetante, pelo que todos os soros com evidência sorológica de aglutininas anti-*Leptospira* spp. pela técnica ELISA devem ser posteriormente analisados pela TAM com vista à identificação do serogrupo provável (Collares-Pereira, 1994)

4.2.3. Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) - técnica de Referência

O teste de aglutinação microscópica (TAM) continua a ser o teste de referência preconizado pela OMS para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans*, ou seja, é o único que só por si permite a identificação provável do serogrupo da estirpe infetante (Collares-Pereira, 1994), o que é uma vantagem acrescida para a respetiva utilização. Tal como a técnica de aglutinação macroscópica anteriormente descrita, a TAM consiste na observação de uma reação “antigénio-anticorpo” por aglutinação, no entanto, esta é apenas visível em microscópio de fundo escuro. É efetuada em microplacas de fundo plano, utilizando soros diluídos numa ou duas diluições iniciais, na 1ª fase do teste, e posteriormente em diluições seriadas ao dobro, com os antigénios “vivos” de referência, que se mostraram inicialmente reativos. Os antigénios são constituídos por (culturas com quatro a 14 dias de crescimento e densidade aproximada de 10^8 bactérias/ml). A(s) amostra(s) “problema” [soro(s)] é (são) considerada(s) positiva(s) quando 50% ou mais de leptospiros estão aglutinados, em regra, a partir da diluição mínima. É conveniente incluir também na bateria de antigénios a utilizar, estirpes isolados localmente de modo a aumentar a sensibilidade do teste (Gonçalves, 2009).

Convém referir igualmente a importância de incluir na bateria de serovares de referência uma estirpe saprófita pertencente a *L. biflexa* (Patoc I), uma vez que esta pode dar a indicação de infeção por *L. interrogans* de uma estirpe desconhecida ou rara, num determinado local. A estirpe saprófita irá mostrar uma reação cruzada com os anticorpos

específicos produzidos contra os serovares patogénicos, sugerindo uma infeção por *Leptospira* spp. (Vieira, 2006).

5 Roedores - reservatórios naturais de *Leptospira* spp

Não sendo o estudo de roedores, no contexto exclusivo de biologia animal, o objetivo principal deste trabalho, considerou-se, no entanto, importante fazer uma breve descrição dos mesmos, uma vez que esse conhecimento permitirá uma abordagem mais assertiva do papel destes, como reservatórios por excelência das leptospiros.

O rato ou murídeo é a designação geral dos mamíferos roedores pertencentes à ordem Rodentia e família Muridae. São animais de hábitos furtivos e geralmente noturnos. Sendo a maior família de mamíferos existentes na atualidade, abrangendo cerca de 650 espécies, agrupadas em cerca de 140 géneros e seis famílias (Randall, 2001). São considerados como pragas, sendo entre estas, os maiores causadores de sofrimento humano (transmissores de agentes de doenças graves tais como os da epidemia da “peste negra” na Europa) e de prejuízos económicos, consomem alimentos armazenados pelos humanos além de provocarem a respetiva destruição (Ruedas, 2008) citado por Crespo (2012). São animais com grande capacidade de adaptação a diferentes meios, podendo viver e fazer ninhos no campo, em celeiros, nos esgotos das cidades, em navios, telhados, sótãos, e nas árvores. Consideram-se como pragas mais graves, as originadas pelos roedores das espécies: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *R. rattus* que apresentam características morfológicas distintas (Randall, 2001).

5.1 *Rattus norvegicus* (Berkenhaut, 1769) - rato castanho

O roedor da espécie *Rattus norvegicus*, também conhecido por rato castanho, ratazana ou rato de esgoto, surgiu na Ásia, onde devido a ação do homem já se encontra espalhado pelo mundo inteiro, (MacDonnald & Tattersall, 2001), citado por Crespo (2012). A ratazana mede cerca de 25 cm de comprimento, cauda mais curta ao do comprimento do corpo, tem orelhas e olhos pequenos, pele áspera e patas com membranas interdigitais. Os adultos pesam de 275 a 575 g. A coloração da pelagem varia entre o castanho-escuro e o cinzento e preto, com coloração mais acentuada na

região ventral (Burnie, 2001), citado por Crespo (2012). Vivem principalmente no solo, em grupos, embora possam ser excelentes trepadores. Convivem em pequenos grupos compostos de um macho e várias fêmeas. São animais com hábitos noturnos, no entanto, podem aumentar a sua atividade diurna quando não se sentem ameaçados por predadores ou quando há abundância de alimentos. A época reprodutiva é no verão e no outono e as fêmeas produzem em média cinco ninhadas por ano com cinco a oito crias por ninhada.

5.2 *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) - rato preto

Rattus rattus, é uma espécie proveniente da Ásia tropical que se espalhou pelo resto do mundo. Habita principalmente na floresta, no entanto, como está muito bem adaptada aos humanos, é comum avistá-lo tanto em zonas rurais como em zonas urbanas, (Macdonald & Tattersall, 2001) citado por Crespo (2012).

Esta espécie de rato é relativamente menor que a ratazana, o comprimento da cauda é normalmente maior que o comprimento do resto do corpo. As orelhas são grandes e tal como a cauda são desprovidas de pelo. Um adulto tem entre 32,4 cm a 46,4 cm de comprimento, 17 a 25 cm de cauda e pesa entre 110 a 340 g, os machos têm tendência a serem mais compridos que as fêmeas.

Tal como a ratazana, são animais noturnos, embora possam ser mais ativos durante o dia quando habitam áreas urbanas, sem predadores. São excelentes trepadores e nadadores, sendo frequentemente encontrados em zonas altas como sótãos de casas e árvores. Vivem em grupos com uma hierarquia estreita, constituídos por indivíduos da mesma família e portadores do mesmo odor, sendo os grupos compostos de vários machos e duas ou mais fêmeas dominantes. A reprodução ocorre principalmente entre março e novembro, mas num ambiente propício, podem reproduzir-se durante todo o ano e terem três a cinco ninhadas por ano, e cada ninhada tem entre uma a 16 crias, embora a média seja de sete crias.

5.3. *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) - rato caseiro

Mus musculus ou rato caseiro é uma das espécies de mamíferos de maior distribuição a nível mundial, como as espécies anteriormente descritas a sua expansão foi em parte facilitada pelo Homem, o que faz com que atualmente se encontre em todos os continentes. Os representantes desta espécie são pequenos roedores com uma longa cauda com 6-10 cm de comprimento aproximadamente, o mesmo que a soma da cabeça e do corpo, (6,5-9,5 cm), os olhos são proeminentes, orelhas grandes e arredondadas e um focinho pontiagudo com longos bigodes acastanhados e preto, os adultos pesam entre 12-30 gramas.

São animais noturnos, podem sobreviver de forma comensal, dependendo do ser humano para o alimento e o abrigo, ou sob forma selvagem, longe das habitações. Vivem geralmente em grandes unidades familiares, os machos são dominantes e acasalam com várias fêmeas. Uma fêmea reprodutora em condições ideais tem seis a oito ninhadas por ano, num total de 50 crias/ano. A gestação dura 19 a 21 dias de acordo com (Randall 2001).

6 Prevenção e controlo de roedores

O controlo e prevenção de roedores não é tarefa fácil, em contextos de extrema degradação ambiental, onde o saneamento e a gestão de resíduos são ainda muito deficitários.

Além dos prejuízos económicos, os roedores estão envolvidos na cadeia epidemiológica de vários agentes de doenças transmissíveis aos humanos e aos animais, como por exemplo a Leptospirose, uma zoonose cuja taxa de incidência humana continua subavaliada em muitos países com particular ênfase, nos países Africanos e particularmente na Guiné-Bissau.

O controlo destes roedores reveste-se assim, de extrema importância na prevenção dos problemas sanitários, ambientais e económicos, relacionados com a presença dos mesmos.

O combate aos roedores baseia-se hoje e cada vez mais no conhecimento da biologia, comportamento, habilidades e capacidades físicas destes animais. A identificação da(s) espécie(s) presente(s) num determinado local é fundamental no sucesso das ações de controlo. Ao determinar-se qual(ais) a(s) espécie(s) presente(s) obtém-se mais facilmente um conjunto de informações preciosas sobre a respetiva biologia, hábitos e capacidades, indispensáveis ao planeamento de uma ação de controlo o que contribuirá para os resultados do referido controlo, como referido no Guia de controlo de roedores nos Açores (SRAFAM, 2012; Crespo, 2012).

As diferentes características de cada espécie em termos de habitat, alimentação ou comportamento podem condicionar, por exemplo, o local onde os postos de engodo e devem ser preferencialmente colocados, o número de postos a utilizar, a distância entre postos, o veneno a utilizar ou o tipo de armadilha/isco mais indicado para capturar cada espécie.

Para se conseguir um controlo efetivo e duradouro dos roedores é necessária uma abordagem integrada. O controlo integrado é um termo abrangente que compreende a aplicação conjunta de várias medidas direcionadas à praga em si, mas também ao ambiente em que esta está inserida. É extremamente raro conseguir-se combater uma infestação por ratos com uma só técnica. O controlo depende da conjugação de várias medidas: preventivas, corretivas e ofensivas ou de eliminação (**Fig. I.3**).

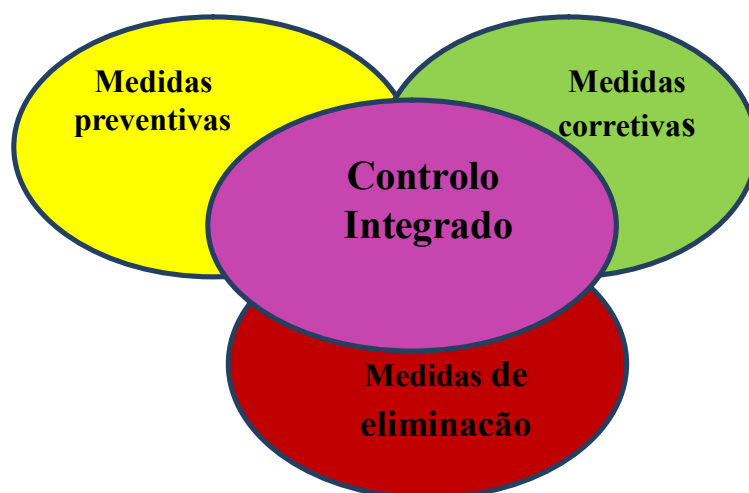


Figura I.3. Controlo integrado de roedores. (*adaptado de DSAP, 2012*).

Assim, a utilização isolada de rodenticidas, sem a implementação conjunta de medidas que tornem o ambiente menos favorável para os roedores impossibilita a obtenção de resultados satisfatórios. O controlo integrado dos roedores pressupõe a conjugação dos três eixos como exemplificado na **(Fig. I.3)** o que pressupõe uma abordagem sistemática em cinco etapas (Inspeção; Identificação; Medidas preventivas e corretivas; desratização e Monitorização).

- **Inspeção**

Consiste em observar o local, em busca de indícios que denunciem a presença de ratos, buscando sempre estabelecer uma relação entre os sinais encontrados e os possíveis trilhos usadas pelos ratos, os locais que sirvam de abrigo e as possíveis fontes de alimento.

- **Identificação**

A identificação da(s) espécie(s) infestante(s) na área alvo é importante para se obter informações sobre a respetiva biologia, hábitos e habilidades dos roedores. Estes conhecimentos são indispensáveis para o planeamento das ações de combate.

- **Medidas preventivas e corretivas (anti-ratização)**

Entende-se por anti-ratização o conjunto de medidas preventivas e corretivas adotadas no ambiente que visam impedir e/ou dificultar a implantação e expansão de novas colónias de roedores. Algumas dessas medidas são corretivas do ambiente e visam a supressão de certas condições que facilitam a infestação dos roedores. Por exemplo: *i)* o lixo deve ser corretamente acondicionado e colocados em sacos, nos contentores e estes devem ser de material que permita a sua higienização, devendo ter a capacidade adequada e estarem colocados sobre um estrado e tapados; *ii)* nunca deverá ser colocado lixo a céu aberto ou em terrenos baldios; *iii)* não deve ser feita canalização de cursos de água a céu aberto; *iv)* os terrenos baldios devem ser mantidos limpos e murados; *v)* devem ser usados ralos e telas metálicas, vedando locais de acesso dos roedores para os ambientes internos; *vi)* deverão ser mantidas limpas as instalações de animais domésticos e não deixar a alimentação exposta onde os ratos possam ter acesso, principalmente à noite; *vii)* deve também evitar-se o acúmulo de entulhos próximos das

residências, etc., e *viii*) também a zona de passagem de tubagem de canalização nas paredes e tetos deve estar completamente vedada, por constituírem locais habituais de passagem de ratos.

De importância fundamental é a educação da comunidade envolvida, isto é, mudar costumes e hábitos das pessoas tais como, deitar fora restos de alimentos, entulhos e papéis, em particular na rua, terrenos baldios, estábulos, espaços vazios em locais públicos, etc.

- **Desratização:**

Entende-se por desratização a utilização de processos capazes de produzir a eliminação física dos roedores infestantes. Podem utilizar-se ratoeiras, armadilhas e outros dispositivos de captura, como também processos químicos onde são utilizadas substâncias chamadas de rodenticidas. Em todo o mundo, o grupo químico mais utilizado são os anticoagulantes por serem muito eficazes e de baixo custo, além de possuírem razoáveis margens de segurança e que fazem efeito somente alguns dias depois da ingestão. Porém, o uso de qualquer produto deve considerar a espécie envolvida e a técnica preconizada pelo fabricante.

- **Avaliação e monitorização**

Por último, é necessária a avaliação dos resultados com um acompanhamento posterior para evitar novas infestações. São, por isso, necessárias inspeções periódicas para identificar os sinais clássicos de infestação por roedores.

7 Prevenção e controlo da Leptospirose

Com mais de 200 serovares patogénicos, e considerando o facto de teoricamente todos os mamíferos poderem ser infetados, e alguns se tornarem portadores crónicos, caso dos roedores, podendo assim disseminar as leptospiros no ambiente toda a vida, a erradicação da leptospirose é praticamente impossível, não obstante existam medidas de controlo que podem passar pela redução do contacto direto ou indireto com as fontes de infeção (Geoffrey & Coleman, 2008).

Como medidas de prevenção “ambiental” destacam-se: *i)* a identificação de áreas e grupos de risco; *ii)* campanhas de desratização; *iii)* a melhoria das condições sanitárias e dos hábitos de higiene das populações; *iv)* o uso de vestuário protetor, como luvas e botas de borracha, em indivíduos expostos a possíveis fontes de contágio, como os trabalhadores de esgotos e de arrozais, de forma a minimizar o contacto com as leptospiros; *v)* a realização de campanhas de sensibilização junto das populações, e *vi)* o tratamento e vacinação de animais.

É ainda de referir, que as vacinas para prevenir a leptospirose humana ainda estão, para a maioria dos países, numa fase embrionária, sendo que as existentes que têm sido testadas até ao presente, não conferem proteção cruzada a outros serogrupos que não aqueles para os quais foram produzidas (Bharti *et al.*, 2003). No entanto, outros problemas limitam o desenvolvimento de uma vacina eficaz para prevenir a leptospirose humana nomeadamente, a imunidade pouco duradoura conferida por estas bactérias (em geral seis a 12 meses), serem serovar-específicas, e geralmente produzirem baixa imunidade. No que diz respeito à vacinação de animais, como cães e bovinos já existem diversas vacinas mas que só previnem os sintomas, mas não a leptospirose e consequentemente a transmissão das leptospiros aos humanos.

A maior barreira ao desenvolvimento de vacinas eficazes e polivalentes contra a leptospirose é, assim, provavelmente a sua aplicabilidade, principalmente em regiões endémicas, em que os indivíduos se encontram expostos a diversos serovares (Shieh *et al.*, 2006; Vijayachari *et al.*, 2008).

PARTE II

***Leptospira* spp na Guiné-Bissau**

1 Introdução

A abundância da literatura sobre leptospirose a nível mundial, contrasta nitidamente com a sua quase inexistência no contexto africano, e os poucos estudos existentes são, sobretudo dos anos 50 do século XX. Ultimamente, tem havido estudos pontuais que confirmam a grande importância desta zoonose em alguns países africanos, como é o caso de Madagáscar onde se detetou DNA leptospírico em 33,9% de uma amostra constituída por 268 roedores (Rahelinirina *et al.*, 2010). Outros estudos recentes tanto em humanos como em animais, demonstram claramente a tendência crescente da leptospirose em África. (Felt *et al.*, 2011; Halliday *et al.*, 2013; Jobbins *et al.*, 2013).

No que se refere à ocorrência da leptospirose na Guiné-Bissau, até ao presente, apenas se conhecem dois trabalhos publicados. O primeiro artigo publicado sobre o assunto (Trincão, 1950) citado por Collares-Pereira & Baptista (1992), que refere a ausência de aglutininas anti-*L.interrogans* s.l. em 58 indivíduos da tribo Balanta e 39 da tribo Manjaca, resultado, muito discutível segundo os mesmos autores, dado o reduzido número de estirpes utilizadas (apenas três) no referido estudo.

O segundo trabalho, já com mais de duas décadas, conduzido por Collares-Pereira & Baptista (1992), reporta igualmente um inquérito serológico nos humanos, confirmando que a infeção pelo género *Leptospira* era, à época, uma realidade na República da Guiné-Bissau, afetando 10,3% da população estudada [6,1-16,0%, com IC de 95%]. O mesmo estudo sugeriu também que ambos os géneros estavam sujeitos a idêntico risco de infeção, não existindo diferenças significativas entre eles, dada a atividade rural da população estudada, contrariamente ao que se verifica noutros países, em particular, em zonas urbanas, onde a doença afeta predominantemente o género masculino (WHO, 2003). O estudo concluiu que dos serogrupos presuntivos das estirpes infetantes determinadas foi o serogrupo Australis (serovar Bratislava) o principal responsável pela seropositividade obtida em oito dos 17 casos positivos.

Porém, da revisão da literatura efetuada verificou-se não existir nenhuma publicação referente à Guiné-Bissau no que respeita à avaliação da taxa bacteriológica de

leptospiras nos roedores e, por consequência, ao papel dos mesmos na epidemiologia da leptospirose no país.

Apesar da ampla distribuição mundial, a leptospirose é mais frequente em regiões tropicais do que em regiões de clima temperado (Levett, 2001). Isto ocorre, principalmente, devido às condições ambientais, temperatura e humidade elevadas que favorecem a manutenção da bactéria no ambiente. A doença é predominantemente sazonal, nos países de clima tropical onde se observam epidemias durante as estações das chuvas ou após desastres naturais (Sarkar *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, constatou-se um aumento das notificações da doença em vários países do mundo tais como, Nicarágua, Austrália, Estados Unidos, Índia, Malásia e Brasil, entre outros.

De acordo com alguns estudos são notificados no mundo, cerca de 300 a 500 mil casos de leptospirose por ano (WHO, 2003). Na América Latina e na Ásia, por exemplo, são frequentes epidemias urbanas (Levett, 2001; Picardeau, 2013) .

Epidemias e surtos associados à doença febril com hemorragia pulmonar e alta letalidade têm sido relatados (Zaki & Shieh, 1996). A letalidade depende, entre outros fatores, do serovar infetante, da gravidade da forma clínica, da não precocidade do diagnóstico, do tratamento prescrito e da faixa etária do paciente. As formas graves da doença produzem uma taxa de letalidade que pode variar entre 5% e 40% (Zunino & Pizarro, 2007) citado por Oliveira (2009).

Existem relatos da doença como consequência de risco ocupacional, sendo observada em trabalhadores de arrozais, canaviais, minas, tratadores de animais, fazendeiros, agricultores e médicos veterinários (entre outras profissões), com prevalências variando entre 10,4 e 28,5% (Almeida *et al.*, 1994) .

Nos centros urbanos, o crescimento desordenado, juntamente com a produção de lixo, propiciam condições ambientais favoráveis para a reprodução da população de roedores (Figueiredo *et al.*, 2001). As fortes chuvas sazonais em regiões tropicais, ao provocarem enchentes e inundações, podem ocasionar epidemias de leptospirose em áreas urbanas, constituindo uma condição favorável para a exposição da população aos agentes da doença, ocorrendo assim a transmissão hídrica (Barcellos, 2001). Também as alterações

ambientais, resultantes da destruição das áreas ribeirinhas, modificam o curso natural e o fluxo dos rios, facilitando a maior extensão das inundações. Outro fator importante é a altitude, pois as áreas mais baixas podem acumular coleções de água ou interferir no curso das enchentes e aumentar a intensidade dos desastres naturais (Barcellos, 2001). Entretanto, Avila-Pires (2006) defende a hipótese de que, nos períodos das enchentes, há maior sensibilidade das autoridades sanitárias e dos clínicos na notificação e solicitação de exames para o diagnóstico da doença o que, de algum modo, pode criar um artifício em relacionar a elevada detecção de casos com a elevada pluviosidade.

2 Justificação do Tema

É bem conhecida a importância dos roedores na manutenção e dispersão das leptospiros no ambiente e, por consequência, pela ocorrência de casos leptospirose. O conhecimento da epidemiologia da infecção nos roedores contribui para o conhecimento e controlo da mesma nos humanos (Wun-Ju *et al.*, 2006) .

A variedade e a inespecificidade do quadro clínico inicial nos humanos e o facto da existência de um síndrome febril no contexto tropical ser comumente interpretada como malária, ou algum tipo de arbovirose, febre tifoide, ou outra doença que curse com febre, exige o recurso a métodos laboratoriais para confirmação do diagnóstico quer destas doenças, quer da leptospirose.

Também as dificuldades de ordem técnica, a ausência de recursos humanos e materiais, são fatores que aliados a condições ambientais favoráveis à presença de leptospiros podem acarretar graves problemas de saúde pública em países como a Guiné-Bissau, permitindo eventualmente a existência de casos não-diagnosticados de leptospirose nas populações humana e animal. Uma vez que se trata de uma doença bacteriana tratável com antibióticos, o seu correto diagnóstico permitiria diminuir a morbidade e mortalidade a ela associada.

Como anteriormente referido, os roedores são considerados os principais reservatórios das leptospiros, sendo-lhes atribuída a maior responsabilidade pela transmissão das mesmas. Importância especial deve ser atribuída à espécie *Rattus norvegicus*, conhecida também como ratazana de esgotos, a principal espécie transmissora nos centros

urbanos; a sua proliferação em contexto tropical ocorre geralmente nos grandes aglomerados populacionais, onde a rede pluvial e rede de esgoto não recebem tratamento adequado e com frequência se interconectam, possibilitando uma maior contaminação ambiental e a subsequente infecção humana acidental (Sarkar *et al.*, 2002). Contudo, outros animais, especialmente os cães, participam na cadeia de transmissão. Estes, quando infetados nem sempre mostram sintomas muito marcados mas podem eliminar leptospiros na urina durante meses (Levett, 2001).

3 Objetivos do estudo

3.1 Objetivo Geral

Com este estudo pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento da importância epidemiológica e ecológica dos roedores como reservatório de *Leptospira* spp. na cidade de Bissau (Guiné-Bissau) e áreas limítrofes, determinando a taxa bacteriológica das referidas espiroquetas na população de roedores estudados.

3.1.1. Objetivos específicos

- 1 - Investigar o papel das diferentes espécies de roedores na disseminação dos agentes causais da leptospirose na área de estudo;
- 2 - Identificar a situação atual de existência e distribuição de leptospiros na cidade de Bissau e áreas limítrofes, determinada pela presença dos roedores na cadeia de transmissão das leptospiros;
- 3 - Contribuir para a perceção e conhecimento de possíveis fatores e áreas de risco de leptospirose, assim como auxiliar no desenvolvimento da vigilância e controlo dos fatores ambientais predisponentes à existência de leptospirose na população.

4 Material e Métodos

4.1 Caracterização da área de estudo

Bissau é a capital política, económica e administrativa da Guiné-Bissau. A cidade de Bissau é o maior centro urbano do país e onde estão concentrados os serviços, caracteriza-se igualmente pelo facto de ser um contínuo urbano-rural.

A República da Guiné-Bissau fica situada na costa ocidental do continente africano. Politicamente, o país tem vivido situações de instabilidade política e institucional e a recorrência da violência, materializada por repetidos golpes de estado e conflitos armados. Do ponto de vista administrativo, a Guiné-Bissau está dividida em oito regiões: Bafatá, Biombo, Bolama-Bijagós, Cacheu, Gabú, Oio, Quínara e Tombali. As regiões estão por sua vez subdivididas em 36 sectores e um Sector Autónomo (PNDS II, 2008).

Dadas as características geográficas das regiões administrativas de Bolama-Bijagós (essencialmente composta por ilhas) e de Cacheu e a capacidade logística do Ministério da Saúde em fazer face às necessidades de respostas de urgência, subdividiram-se essas duas regiões em quatro. Assim, o mapa sanitário apresenta-se com 11 regiões sanitárias, incluindo o Setor Autónomo de Bissau.

As referidas regiões sanitárias foram divididas em 114 áreas sanitárias (o nível mais próximo das comunidades), definidas com base em critérios geográficos, abrangendo uma população que varia entre os 5.000 e os 12.000 habitantes. Mesmo assim, mais de 40% da população vive a uma distância superior a 5 km, das estruturas de prestação de cuidados primários de saúde, mais próximas. (PNDS II 2008).

A população da Guiné-Bissau foi estimada em cerca 1.548.159 habitantes (taxa de crescimento anual de 2,05%) e caracterizada como uma população muito jovem: cerca de 48% da população tem menos de 15 anos de idade e 63,3% com menos de 25 anos. As mulheres representam mais 51% da população. A esperança média de vida é de 48,6 anos (UNPD 2013). Cerca de 30% de toda a população guineense a viver no país encontra-se no Setor Autónomo de Bissau (PNDS II 2008), onde se realizou o presente estudo (**Fig. II.1**).

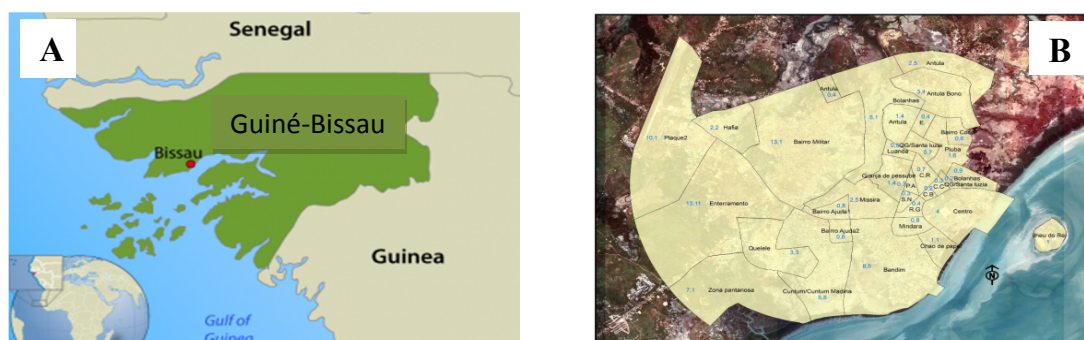


Figura II.1. **A** - Localização geográfica da Guiné-Bissau; **B** - Cidade de Bissau (Fonte: *adaptado* de Silva, 2010)

4.2 Trabalho de Campo – Roedores

4.2.1. Estratégia de amostragem e determinação de zonas de captura

Antecedendo o início da captura de roedores, foram contactadas as Autoridades responsáveis pelo controlo de pragas e gestão de resíduos sólidos (lixo) e a Câmara Municipal de Bissau (CMB), no sentido de identificar e evitar as zonas onde estava a decorrer, na altura, uma ação de desratização, sobretudo com produtos químicos.

Os roedores foram capturados vivos, nas zonas que integram o estudo (sete bairros), na cidade de Bissau e áreas limítrofes, conforme descrito abaixo (**Tabela II.1**).

Tabela II.1. Bairros em estudo e as suas respetivas áreas em km².

BAIRROS	ÁREA (Km ²)
Antula Bono	3.433
Bandim	8.498
Bissau Velho	3.995
Chde Papel/Varela	1.062
Cuntum/Madina	5.850
Quelelé	3.299
Plaque2/Aeroporto	10.088
Área total	36.224

As zonas foram determinadas pela existência simultânea de aglomerados humanos, lixeiras, pontos de água, esgotos a céu aberto e armazéns de alimentos.

Foram assim estabelecidas entre duas a 10 estações de amostragem em cada bairro, respeitando as condições preestabelecidas, nomeadamente a existência de aglomerados humanos, lixeiras, pontos de água, esgotos a céu aberto e armazéns de alimentos, como documentado nas imagens (**Fig. II.2**).



Figura II.2. Imagens de dois locais onde se realizaram as capturas dos roedores (Armazém e Mercado). (*Fotos originais do autor*)

4.2.2. Tipos de Armadilhas

Neste estudo foram utilizadas armadilhas para captura de animais vivos, do tipo “Tomahawk” (**Fig. II.3**), mas de fabrico artesanal, algumas das quais adquiridas localmente. Foi ainda preparado isco com sardinha em conserva e/ou ‘alimentos’ disponíveis localmente.



Figura II.3. Exemplo das armadilhas utilizadas para captura de roedores. (*Foto original do autor*)

As armadilhas são feitas de uma armação de aço galvanizado com um sistema interior com alavanca que permite o fecho das mesmas após a entrada do animal. Este tipo de

armadilhas permite a captura de animais de pequenas dimensões como os da espécie *Mus musculus* e animais de grande porte como os da espécie *R. norvegicus*. Após a captura, o animal não tem interface com o ambiente exterior.

4.3 Captura de roedores

Antecedendo a captura efetiva dos roedores, e após a devida aprovação do Projeto pelo Comité Nacional da Ética em Saúde da Guiné-Bissau (*Anexo I*), procedeu-se durante uma semana à preparação do pré-isco, nas diferentes estações de captura para testar a eficácia das armadilhas e a preferência alimentar dos roedores. Desta pré-iscagem percebeu-se que o isco a escolher devia ser o alimento disponível habitualmente na estação em causa, por exemplo, nos mercados, geralmente é o peixe cru que funciona melhor do que a introdução de outro isco menos habitual a estes animais, enquanto nos armazéns, os enlatados são mais apetecíveis pelos roedores, sendo disso exemplo a sardinha e mortadela.

Tendo em conta que os roedores têm uma atividade predominantemente noturna (Cunningham & Moors, 1996), as armadilhas foram, em função da estação de captura, diariamente colocadas entre as 19 horas e as 7 horas da manhã do dia seguinte. Após recolha e limpeza são recolocadas à mesma hora.

Os roedores capturados foram acondicionados em gaiolas apropriadas e transportados vivos (**Fig. II.4**) até ao Laboratório Nacional de Saúde Pública (LNSP) da Guiné-Bissau, onde foram necropsiados.



Figura II.4. Transporte dos roedores capturados. (*Foto original do autor*)

4.4 Laboratório - Roedores (Guiné-Bissau)

4.4.1. Identificação e Registo de dados morfométricos dos roedores

A identificação das espécies de roedores capturadas baseou-se nas características morfológicas e/ou morfométricas exibidas pelos espécimes, e previamente descritas (Cunningham & Moors, 1996; Cardoso, 2009). No LNSP, e antecedendo a necropsia, os animais foram sacrificados e registadas as informações quanto à espécie, estatuto reprodutor (pela observação das estruturas reprodutoras externas, como o estágio de desenvolvimento das mamas nas fêmeas, e a dimensão e posição dos testículos nos machos), e outros parâmetros morfométricos (peso, comprimento da cabeça e corpo, cauda, orelhas e pata posterior) como demonstrado (**Fig. II.5**) e (*Anexo II*).

A classificação por grupo etário (juvenis e adultos), foi realizada tendo em conta a conjugação do peso, acrescida de medidas do comprimento total do corpo, mais a medida da cauda, com base na comparação das medidas de cada espécie disponíveis na literatura (Almeida, 2008).



Figura II.5. Registo de dados morfométricos dos roedores. (*Fotos originais do autor*)

4.4.2 Necropsia dos roedores

Para a realização das necropsias (*Anexo III*), com o animal devidamente anestesiado com Isoflurano (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano), um éter halogenado usado para anestesia por inalação. Os animais capturados foram sacrificados, distendidos e fixados numa prancha de disseção em posição decúbito-dorsal. A região dorsal foi desinfetada com algodão embebido em Betadine®. Com auxílio de uma pinça e tesoura efetuou-se uma incisão na linha médio-dorsal que permitiu ter acesso aos

órgãos internos pela separação da camada epitelial superior. Retiraram-se os rins com uma tesoura e pinça devidamente desinfetados com álcool a 70%. Outros órgãos (coração, pulmões, baço) foram também pontualmente colhidos (**Fig. II.6**).



Figura II.6. Necropsia de roedores. (*Fotos originais do autor*)

4.4.3. Acondicionamento, conservação e transporte das amostras

Os rins e os outros órgãos recolhidos foram acondicionados segundo as recomendações e protocolo em uso no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (Unidade de Microbiologia Médica), do Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) e congelados a - 60°C nos Congeladores do Projeto de Saúde de Bandim, até ao seu transporte para o Laboratório de Leptospirose, em Lisboa. Durante o transporte as amostras foram mantidas em caixas térmicas com acumuladores congelados que garantiram que chegassem ao destino em perfeitas condições (**Fig. II.7**).



Figura II.7. Caixa térmica e acumuladores de gelo. (*Fotos originais do autor*)

5 Laboratório - Roedores - Detecção e Identificação de *Leptospira* spp

5.1 Abordagem Molecular

5.1.1. Extração e Purificação de DNA

A extração e purificação do DNA (Ácido desoxirribonucleico) constitui a primeira etapa para a caracterização molecular das amostras, neste caso, do tecido renal de cada roedor capturado (**Fig. II.8**). Para tal foi utilizado um método de extração por recurso a um kit comercial da Citogene[®], contendo todos os reagentes necessários para a extração do DNA.

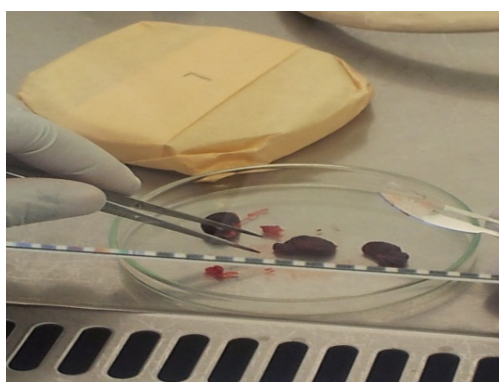


Figura II.8. Preparação e corte do rim para extração do DNA. (Fotos originais do autor)

Este método foi executado respeitando as especificações do fabricante e adaptado de acordo com as condições existentes no laboratório (*Anexo VI*).

5.1.2 Testes de Especificidade e de Sensibilidade dos *primers*

A realização das reações de PCR foram antecedidas dos testes de especificidade e sensibilidade dos *primers* a utilizar para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. (“hap 1” e “lip132”).

Para a determinação da especificidade utilizaram-se amostras de DNA extraído de outras espiroquetas representantes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato e *Treponema pallidum*, além de leptospiros dos serovares/estirpes (Ballum/Arborea e Icterohaemorrhagiae/RGA), representantes de *L. interrogans* s.l. (espécie patogénica);,

a par do serovar Patoc representante de *L. biflexa* (saprófita) e ainda uma cultura de *L. inadai* (espécie intermédia). O controlo negativo foi uma amostra de água autoclavada.

Para o teste de sensibilidade utilizou-se DNA extraído de culturas vivas em diluições seriadas de base 10 até 1 bactéria/ ml, a partir de serovares/estirpes de *L. interrogans* s.l. (Canicola e RGA) com uma densidade de 10^8 bactérias /ml.

Depois de conhecida a sensibilidade e especificidade dos “*primers*”, procedeu-se à amplificação do DNA leptospírico das amostras em estudo.

5.1.3. PCR com os *primers* - “hap 1”

Para amplificação do referido DNA, de acordo com (Branger *et al.*, 2001), foram utilizados *primers* (sequências iniciadoras) que foram obtidas do gene *hap 1* (*hemolysis-associated protein 1*) presente nas espécies patogénicas de *Leptospira*, no caso, no serovar Autumnalis de *L. interrogans* que produz um fragmento com 262 pb (pares de bases) cujas sequências são as descritas abaixo (Tabela II.2).

Tabela II.2. Sequências dos *primers* designados “hap 1”, utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp

Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Fragmento (pb)
<i>hap 1</i>	Forward	ACCGTGATTTTCCTAACTAAGGA	262
	Reverse	AAGCGAGTAAGTAGAATTGAAGGATCGATC	

As soluções utilizadas na reação de amplificação para um volume final de 25µl foram as seguintes: 10 Mm de Tris-HCL, 50 Mm de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 1µM de cada *primer*, (Tab 3) e 1 U da Taq polimerase (Bioline®). Foram adicionadas 2µl (~40 µg/ml) da DNA “template” (= molde), e água ultra pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas num termociclador *MyCycler* (BioRad®) programado com as condições ótimas de amplificação, de acordo com o protocolo em uso no laboratório (Tabela II.3).

Tabela II.3. Condições ótimas de PCR com os *primers* “hap 1”

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação	95	5 min	1
Desnaturação	94	15s	45x
Emparelhamento	56	35s	
Extensão	72	40s	
Extensão final	72	10 min	1

A reprodutibilidade dos resultados foi assegurada pela repetição dos testes.

5.1.4 *Nested*-PCR com *primers* “lipL32”

Este protocolo é constituído por duas reações. Utilizaram-se os *primers* designados por “lipL32” desenhados numa região do gene *lipL32* que codifica a proteína de superfície com o mesmo nome LipL32, previamente descritos (Jouglard *et al.* 2006), sendo que o segundo par de *primers* amplifica uma outra região dentro da anteriormente amplificada, aumentando assim, deste modo, a sensibilidade do método (Jouglard *et al.*, 2006). A Tabela II.4, mostra as sequências dos *sets* de *primers* utilizados.

Na primeira reação da PCR, utilizou-se uma solução com um volume total de 25 µl, constituído por 10µl (~ 40µg/ml) do DNA molde da amostra, tampão de reação NH4 1x [16 Mm (NH₄)₂SO₄, 67 Mm tris-HCl (pH 8,8) (Bioline®), 2,5 mM, MgCl₂ (Bioline®), 0,5 mM de cada dNTP (Bioline®), 1 pmol de cada *primer* (Tabela II.4), 1U da Taq polimerase (Bioline®) e água ultra pura para perfazer o volume final.

Tabela II.4. Sequências dos *primers* ‘lipL32’ utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp. por *nested* PCR

Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Fragmento (pb)
lipL32	Forward	TTC TGA GCG AGG ACA CAA TCC C	183
	Reverse	CTC CCA TTT CAG CGA TTA CGG	
			
Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Fragmento (pb)
lipL32	Forward	CGC TTG TGG TGC TTT CGG TGG T	264
	Reverse	CTC ACC GAT TTC GCC TGT TGG G	

Na segunda reação da PCR mantiveram-se as condições utilizadas na primeira PCR, com exceção do volume de DNA (molde) que nesta reação foi apenas de 1µl do produto de amplificação da primeira PCR e foi ajustado o volume de água ultra pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas num termociclador *MyCycler* (BioRad®) programado com as condições ótimas de amplificação (**Tabela II.5**).

Tabela II.5. Condições ótimas da (1ª e 2ª amplificação) com *primers* “lipL32”

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de Ciclos
Desnat. inicial	94	5min	1
Desnaturação	94	1 min	32x
Emparelhamento	55	1 min	
Extensão	72	1 min	
Extensão Final	72	7 min	1

5.1.5. Sequenciação de DNA de *Leptospira* spp.

Dos 30 produtos de PCR obtidos com os *primers* "hap1" e 'lipL32', 12 amostras foram sequenciadas para determinação da espécie genómica de *Leptospira*. As sequências obtidas foram depois analisadas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para determinação do grau de similaridade face a sequências conhecidas das diversas genoespécies de *Leptospira* depositadas no GenBank,

5.2 Cultura de tecido renal em meio de EMJH

Na perspetiva de isolamento de leptospiros a partir de tecido renal, procedeu-se à sementeira direta do referido tecido homogeneizado, em meio de cultura seletivo, semissólido de EMJH (*Anexo IV*), sendo este o método ideal, considerado mesmo o *gold standard* para determinar a presença de leptospiros nas amostras em estudo.

Os procedimentos de isolamento são morosos e o crescimento *in vitro* das leptospiros é fastidioso, requerendo preferencialmente amostras frescas, embora as leptospiros sobrevivam a temperaturas de congelação (-80°C) de acordo com Levett (2001). No presente estudo apesar da limitação decorrente da impossibilidade de dispor de amostras frescas, procedeu-se a cultura aleatória de amostras homogeneizadas de tecido renal obtido de 11 rins, correspondendo a 10% do total de roedores capturados, conforme o protocolo de procedimento utilizado no laboratório (*Anexo V*).

5.3 Tratamento e análise de dados

Para análise dos dados do estudo foi criada propositadamente uma base de dados [*Excel (Microsoft Office)*, versão 2007], para apoio da caracterização morfométrica e análise da distribuição dos roedores, assim como para os resultados das análises laboratoriais. Utilizou-se também estatística descritiva (distribuição de frequências), para a qual se recorreu a gráficos e tabelas. Para a análise de variáveis qualitativas utilizaram-se tabelas de contingência, tendo sido aplicado o teste de Qui-quadrado (χ^2) e de Fischer (sempre que necessário), tendo sido considerado um nível de significância de ($p < 0,05$).

6 Resultados

6.1 Caracterização da Amostra

As capturas realizadas em Bissau, nas áreas previamente definidas e de modo aleatório, no período compreendido entre junho e agosto de 2013, permitiram a obtenção de um total de 104 roedores.

Todos os animais foram capturados vivos e posteriormente anestesiados de modo a ser possível realizar a observação de características morfométricas e outras, de acordo com a **Tabela II.6**. A referida tabela resume as principais características observadas nos diversos espécimes, as quais por comparação com as tabelas de classificação usadas para o efeito, permitiram identificar todos os roedores capturados.

Tabela II.6. Resumo das principais características dos roedores capturados

Características			
	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>M. musculus</i>
Corpo	Robusto	Esguio	Esguio
Comprimento (Corpo + Cauda)	22 cm	20 cm	9 cm
Cauda	16 a 25 cm	19 a 25 cm	7 a 11 cm
Peso	150 a 600 g	100 a 350 g	10 a 21g
Orelhas	Relativamente pequenas, normalmente meio inseridas no pelo 20 a 23 mm	Grandes e proeminentes, finas sem pelo 25 a 28 mm	Proeminentes, grandes para o tamanho do animal $\pm$ 10 mm
Focinho	Arredondado	Afilado	Afilado
Habitat	Tocas e galerias no subsolo, perto de esgotos, lixeiras interior de instalações	Forros sótãos, paióis, silos e armazéns, árvores	No interior de móveis despensas armários
Raio de ação	Cerca de 50 m	Cerca de 60 m	Cerca de 3 a 5 m
Alimentação	Omnívoro, prefere grãos, carnes ovos e frutas	Omnívoro, preferência por legumes frutas e grãos	Omnívoros, preferência por grãos e sementes

Assim, de acordo com as características estabelecidas acima (**Tabela II.6**) em particular as morfométricas, foi possível estabelecer a respetiva identificação. Foram identificadas três espécies, *Rattus norvegicus*, *R. rattus* e *Mus musculus* (**Fig. II.9**).



Figura II.9. Exemplos representativos de roedores das três espécies capturadas: **A** - *Rattus norvegicus*; **B** - *Mus musculus* e **C** - *R. rattus*. (Fotos originais do autor)

Do total de roedores capturados (N=104), no que respeita à identificação por espécie, os resultados mostraram que *Rattus norvegicus* com (n=66) exemplares capturados foi a espécie mais representada, seguida da espécie *Mus musculus* (n=36), e de *R. rattus*, com apenas dois exemplares, como representado na **Fig. II.10**.

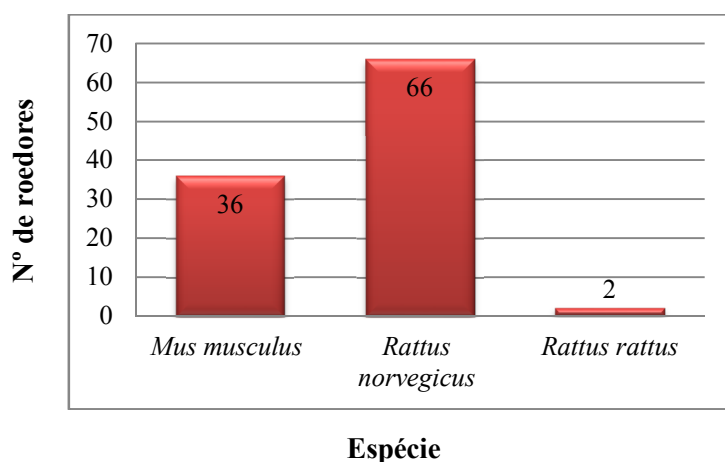


Figura II.10. Representação gráfica da distribuição da amostra de roedores capturados (N=104) de acordo com a respetiva espécie.

Quanto ao ‘género’ verificou-se que a amostra era constituída por 69 fêmeas (♀) e 35 machos (♂), e no que respeita ao estágio de desenvolvimento, 77 eram adultos e 27 juvenis (**Fig. II.11**). Por sua vez, estes adultos e juvenis tiveram a seguinte distribuição percentual: *M. musculus* (75% adultos e 25% juvenis); *R. norvegicus* (74,2% adultos e 25,8% juvenis) e *R rattus* (50% adultos e 50% juvenis).

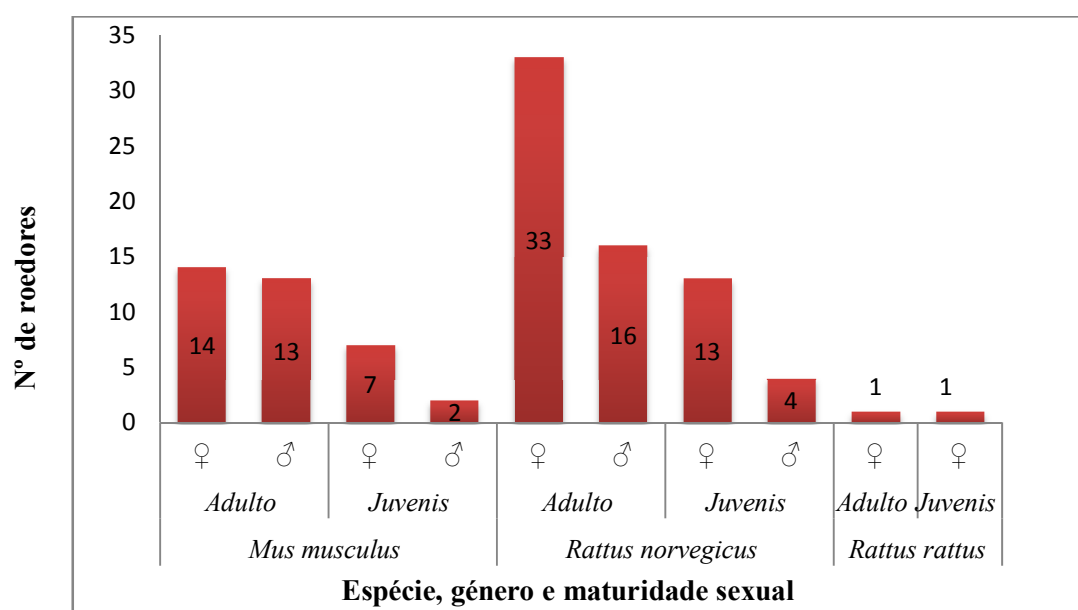


Figura II.11. Distribuição de roedores por espécie, género (♂ e ♀) e estágio de desenvolvimento.

De acordo com as zonas de captura, e atendendo aos critérios já descritos no ponto 1.3 (Material e Métodos) do presente trabalho, foram identificadas sete zonas (**Fig. II.12** e **Tabela II.7**).

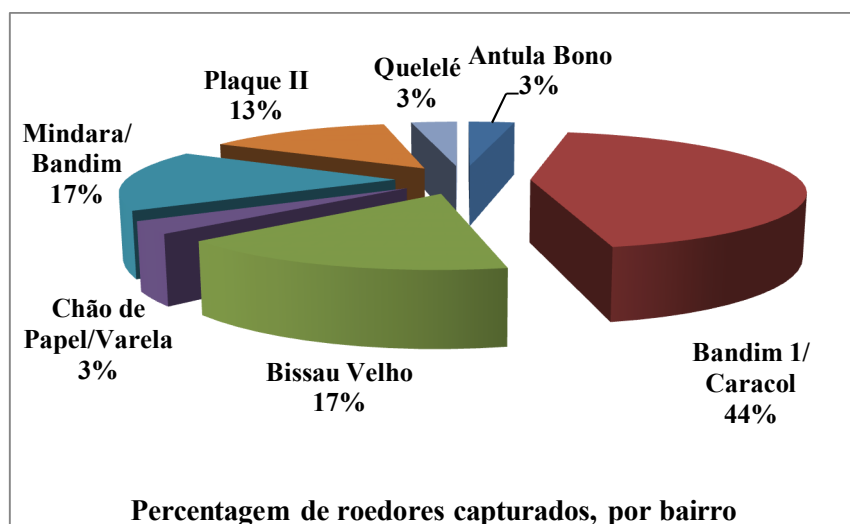


Figura II.12. Distribuição percentual do total de roedores capturados por bairro.

Tabela II.7. Distribuição do total de roedores capturados por bairro e por espécie

BAIRROS	Roedores (Espécies)			Total parcial
	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Rattus rattus</i>	
Antula Bono	5	1	-	6
Bandim 1/Caracol	19	30	1	50
Bissau Velho	3	8	-	11
Chão de Papel / Varela	1	3	-	4
Mindara/Bandim	5	11	-	16
Plaque II	2	7	-	9
Quelelé	1	6	1	8
Total global	36	66	2	104

Em relação ao habitat dos roedores, os resultados aqui apresentados correspondem a dois critérios definidos: “Habitat exterior” que incluiu todas as capturas feitas no exterior de edifícios e/ou habitações, nomeadamente, nos mercados, nas lixeiras, e nos pontos de água com muita atividade humana; e o “Habitat interior” que incluiu as capturas realizadas no interior dos edifícios, nomeadamente nas habitações de particulares, nos armazéns de revenda de géneros alimentícios e nos estabelecimentos de venda de comida (Restaurantes).

Assim, do total de roedores capturados [$n = 78$; (75%)] foram capturados no exterior, e [$n=26$; (25%)] resultaram do esforço de captura no interior dos edifícios, conforme documentado na **Fig. II.13**.

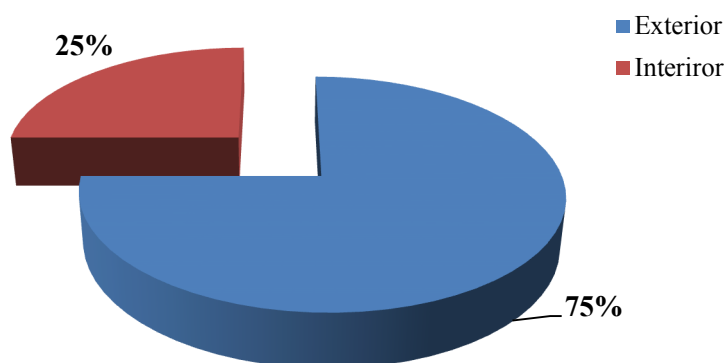


Figura II.13. Distribuição de roedores por habitat de captura

6.2 Testes moleculares

6.2.1. Teste de especificidade e sensibilidade dos *primers* “hap1”

- Teste de especificidade

O ensaio de especificidade dos *primers* “hap1” mostrou que os mesmos são específicos para *L. interrogans* s.l. dado que não foi observada amplificação de DNA das outras espiroquetas utilizadas, isto é, *Borrelia burgdorferi* s.l. e *Treponema pallidum*, bem como de leptospiros saprófitas da espécie *L. biflexa* (serovar Patoc). Houve apenas a

amplificação de DNA de leptospiros patogénicas (**Fig.II.14**), no caso, representantes dos serogrupos (estirpes) Icterohaemorrhagiae (RGA) e Ballum (Arborea).

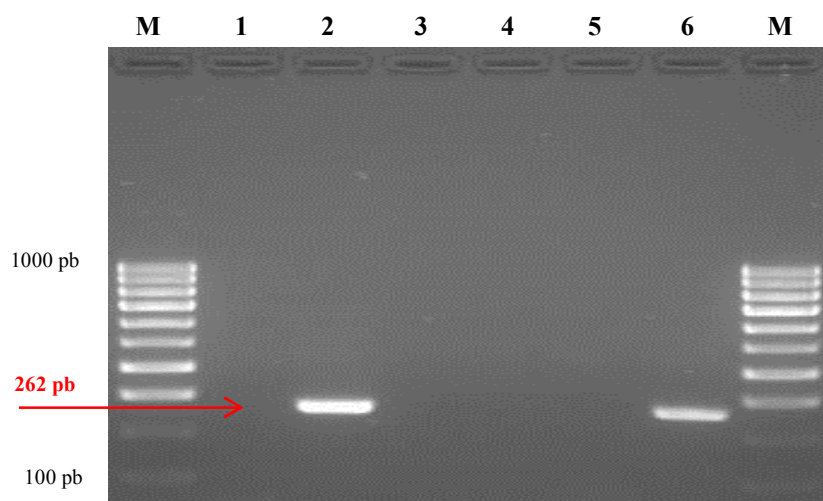


Figura II.14. Resultado do teste de especificidade com os *primers* “hap1” (262 pb) de serogrupos patogénicos de *L. interrogans*. M – marcador molecular (100-1000 pb); 1- Patoc (*L. biflexa*); 2 - Icterohaemorrhagiae (RGA); 3 - *Borrelia burgdorferi* s.l.; 4 - *Treponema pallidum*; 5 - Controlo negativo; 6 - Controlo positivo Ballum (Arborea)

• Teste de sensibilidade

Quanto à sensibilidade da reação de PCR, obteve-se amplificação de DNA de diluições seriadas de uma cultura de leptospiros da estirpe RGA (Icterohaemorrhagiae), entre outras culturas utilizadas (leptospiros saprófitas e intermédias), partindo de uma cultura com uma densidade de 10^8 bactérias/ml.

A amplificação correspondeu a um fragmento de 262 pb como mostra a **Fig. II.15**, na qual se pode observar nitidamente deteção de DNA até à diluição 10^5 bactérias/ml, no entanto foi ainda visualizada no gel uma banda correspondente à diluição 10^4 , apesar de muito ténue e, por isso, quase impercetível na foto a que a figura faz referência.

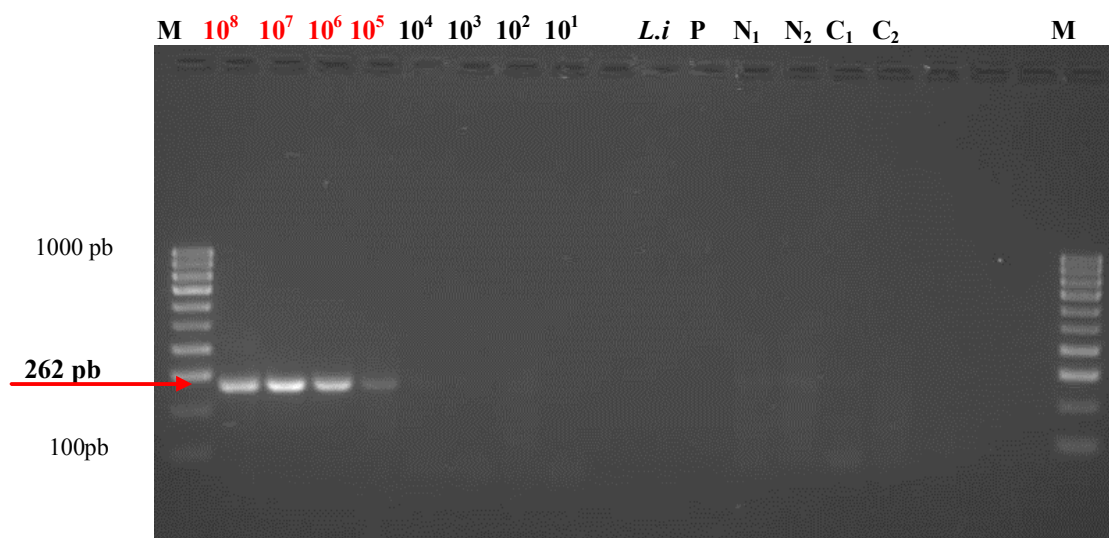


Figura II.15. Resultado do teste de sensibilidade da PCR com *primers* “hap1” (262pb) em diluições seriadas de culturas do serogrupo Icterohaemorrhagiae (RGA). **Legenda:** M - Marcador molecular (100 -1000 pb); (10^8 - 10^1) - diluições de RGA (10^8 -10 bactérias/ml); *L.i* - *L. inadai*; P - Patoc; C.ext_{1,2} - controlo negativo da extração de DNA; CN_{1,2} - controlo negativo da PCR (água autoclavada).

6.2.2. Testes de especificidade e sensibilidade dos *primers* “lipL32” (*nested-PCR*)

Para o protocolo de PCR dos *primers* “lipL32” também foram realizados testes de especificidade e sensibilidade, da mesma forma que foram feitos para os *primers* anteriores, tendo-se obtido uma especificidade de 100%, e uma sensibilidade até à diluição de 10^2 bactérias/ml para leptospiros parogénicas.

6.2.3. Amplificação de DNA de *Leptospira* spp com os *primers* “hap 1” e “lipL32”

❖ Amplificação de DNA com os *primers* “hap1”

A aplicação do protocolo da PCR com os *primers* “hap1” amplificou DNA leptospírico em 23⁺/104 das amostras de roedores, conforme se exemplifica na **Fig.II.16**.

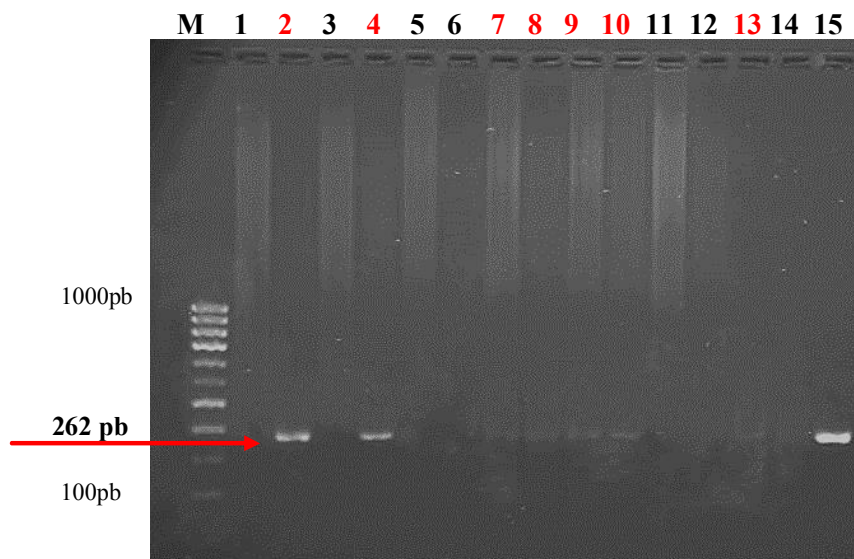


Figura II.16. Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os *primers* “hap1” (262pb); **Legenda:** 1 a 13 – Amostras de tecido renal de roedores (**amostras positivas**); 14 – Controlo Negativo; 15 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb).

❖ Amplificação de DNA com os *primers* “lipL32” (*nested-PCR*)

Foi aplicado o protocolo de PCR com os *primers* “lipL32” (*nested-PCR*) ao DNA extraído de 33 amostras de tecido renal dos roedores, número resultante das 23 amostras anteriormente amplificadas pelo protocolo “hap1” a que se adicionaram aleatoriamente mais 10 amostras que tinham sido negativas no referido protocolo.

O resultado obtido por este último protocolo (“lipL32”) evidenciou também a presença de DNA leptospírico (**Fig.II.17**) nas 23 amostras que já haviam tido resultado positivo, e em mais sete outras amostras, negativas nos ensaios com o protocolo “hap1”, pelo que o resultado da deteção de DNA de *Leptospira* spp. foi de 30⁺/33, isto é, 90% das amostras usada no 2º protocolo.

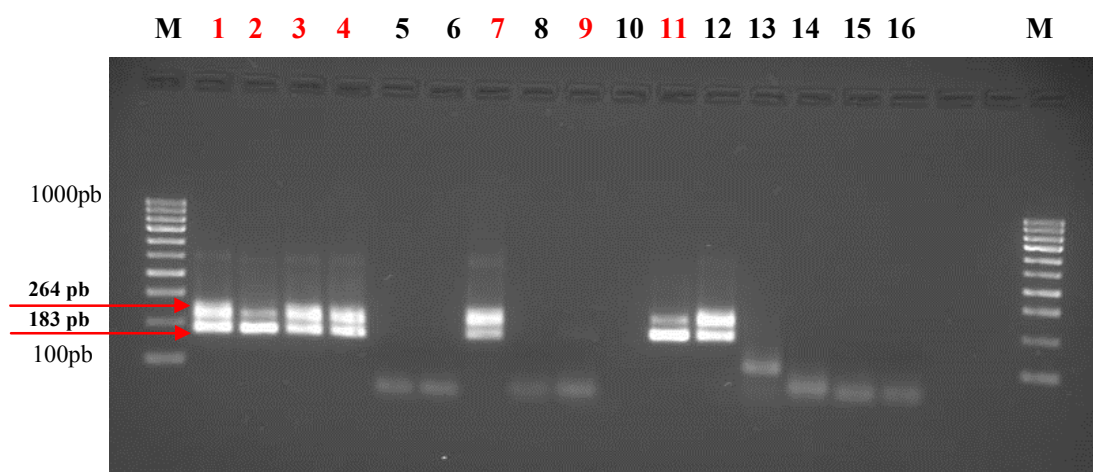


Figura II.17. Exemplo da amplificação de DNA leptospírico com os *primers* “lipL32” (*nested*-PCR) – amplificação de fragmentos de 183pb e de 264pb; Legenda: 1 a 11 – Tecido renal de roedores (**amostras positivas**); 12 – Controlo Positivo (RGA); 13 a 16 – Controlos Negativos; M – Marcador molecular (100pb).

Na avaliação dos resultados de PCR *versus* as espécies de roedores capturadas, verificou-se que 20 dos roedores onde se detetou a presença de DNA leptospírico pertencem à espécie *Rattus norvegicus*, nove pertencem à espécie *Mus musculus*, e um à espécie *Rattus rattus* (**Fig.II.18**).

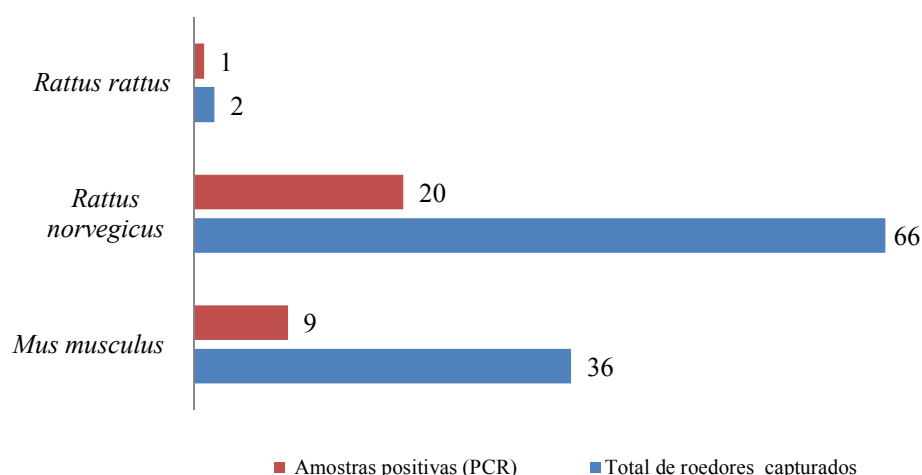


Figura II.18. Representação gráfica da distribuição de roedores *versus* presença de DNA de acordo com a espécie .

Idêntica avaliação foi também efetuada em relação ao género (♂ e ♀), como documentado abaixo (Fig. II.19).

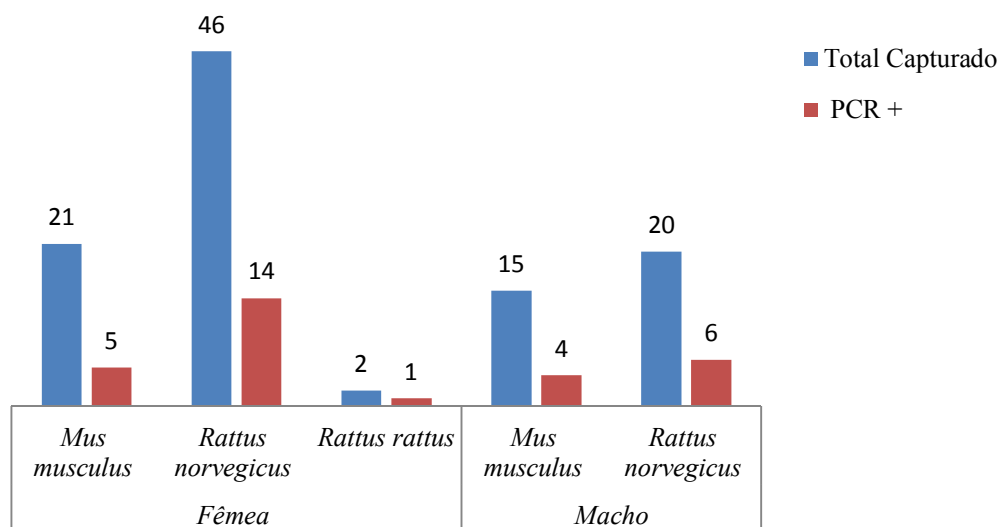


Figura II.19. Representação gráfica da distribuição de roedores *versus* presença de DNA leptospírico de acordo com a espécie e género. (♂ e ♀).

Em relação ao habitat de captura, observou-se que em 70% (n=20) dos roedores capturados no exterior e 30% (n=10) capturados no interior, foi detetado DNA leptospírico.

Foi também determinado o grau da infestação por local de captura, onde os critérios definidos foram “interior” e “exterior”. Globalmente, foram realizadas mais capturas no exterior dos edifícios (n=78) comparativamente às do interior (n=26) (Fig. II.20).

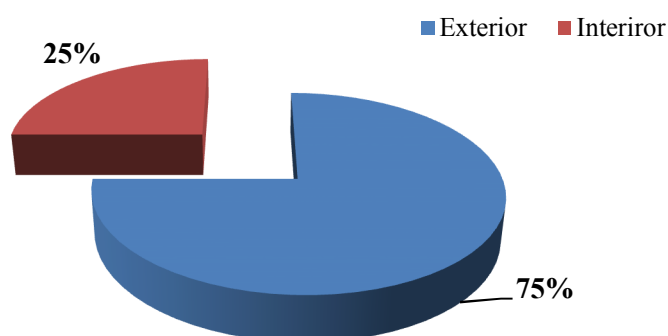


Figura II.20. Percentagem de infestação de roedores nas instalações (interiores e exteriores).

Constatou-se também, que a espécie que mostrou uma maior frequência nas capturas no interior dos edifícios foi a espécie *M. musculus*, enquanto que a espécie mais capturada no exterior foi *R. norvegicus*.

Relativamente aos resultados obtidos pela técnica de PCR, em relação à distribuição dos roedores capturados por género (♂ e ♀) e habitat, verificou-se que o maior número de amostras com resultado positivo correspondeu às fêmeas capturadas no exterior dos edifícios (**Fig. II.21**).

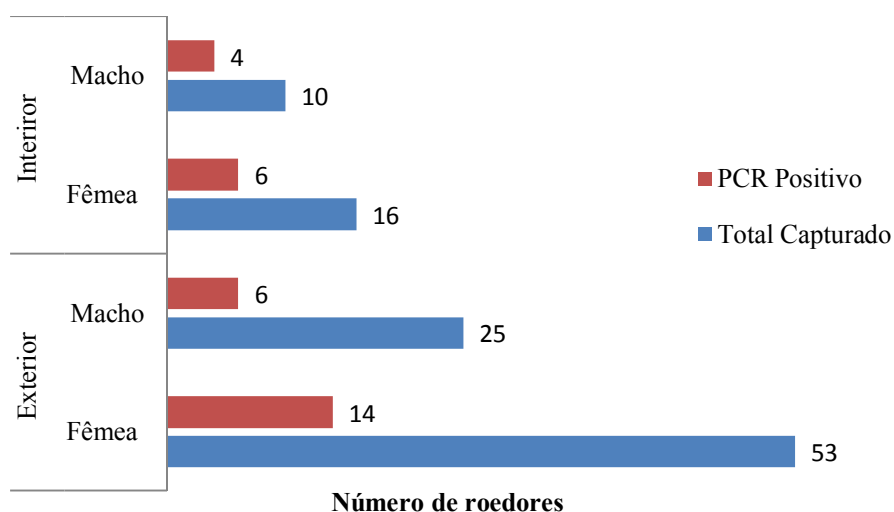


Figura II.21. Distribuição das amostras (roedores) em que foi detetado DNA de *Leptospira* spp *versus* género e habitat

Relativamente ao local de captura, o bairro Bandim/Caracol destacou-se com o maior número de roedores capturados, tendo sido a espécie *R. norvegicus* a mais frequente, seguindo-se o bairro Mindara/Bandim (**Fig. II.22**). De salientar ainda que estas zonas correspondem a zonas de mercados, onde a abundância de roedores é claramente perceptível pela própria população.

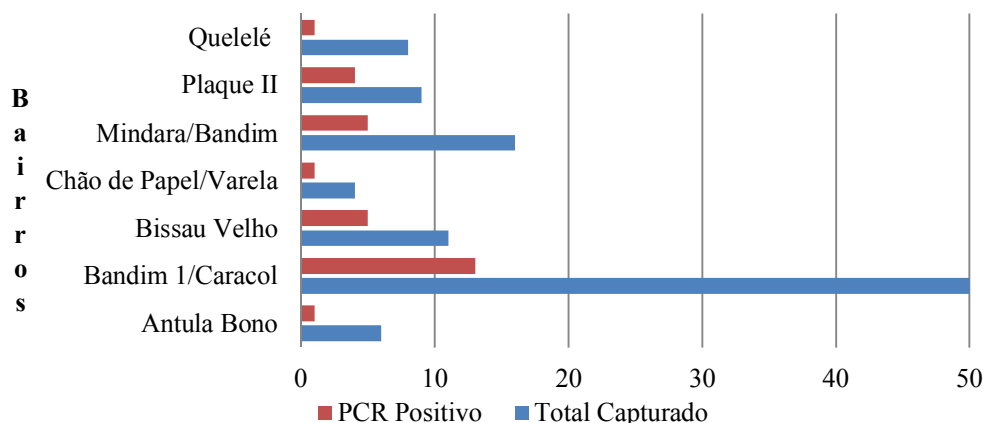


Figura II.22. Distribuição dos roedores com PCR positivo de acordo com o bairro onde foram capturados.

Na **Tabela II.8**, faz-se um resumo dos resultados moleculares obtidos quanto à presença de DNA de *Leptospira* spp. no total de roedores capturados (N=104), *versus* a espécie de roedor e o género (♂ e ♀)

Tabela II.8. Resumo dos resultados obtidos pela PCR (dois protocolos) de acordo com a espécie e ‘género’ (♂ e ♀) *versus* o total da amostra (N=104)

Espécie	Nº Roedores capturados / género	Roedores c/ DNA leptospirico	(%)
<i>Mus musculus</i> (n=36)	15 ♂	4	26,6
	21 ♀	5	23,8
<i>Rattus norvegicus</i> (n=66)	20 ♂	6	30,0
	46 ♀	14	30,4
<i>Rattus rattus</i> (n= 2)	0 ♂	0	
	2 ♀	1	50,0

Dos resultados obtidos quanto à presença de DNA de *Leptospira* spp. nos roedores das espécies *R. norvegicus* e *R rattus*, verificou-se, após a aplicação do teste Qui-quadrado

e/ou de Fischer, um valor de $p = 0,736$. Idêntico resultado foi obtido, quando se analisou a taxa bacteriológica *versus* o género (♂ e ♀) dentro de cada uma das espécies de roedor com presença de leptospiros, tendo os valores de p sido 0,798 e 1,00, para *R. norvegicus* e *M. musculus*, respetivamente.

6.2.3. Cultura

Até à data não foram obtidos resultados das culturas em curso, sendo que um resultado positivo por esta abordagem será já pouco provável. No entanto, não se pode ainda considerar como definitiva a atual ausência de crescimento de leptospiros, considerando que as condições de que se partiu não foram as ideais e que o processo de crescimento pode prolongar-se durante meses, pelo que o presente resultado não pode ainda excluir a possibilidade de obtenção de algum ‘novo’ isolado, a partir das culturas processadas.

6.2.4. Sequenciação de produtos amplificados (DNA leptospírico)

Do total de amostras com presença de DNA de *Leptospira* spp, foram selecionadas aleatoriamente 10 (33,3 %) do total das 30 amostras para sequenciação.

As sequências obtidas como demonstrado abaixo, a título de exemplo, após análise por BLAST, mostraram uma similaridade de 99% com a espécie genómica *Leptospira interrogans*, serovar Icterohaemorrhagiae (**Fig.II.23**) e ainda com a espécie *L. kirchneri*.

Foward

AGNGCAGCATTACCGCTTGTGGTTCGNGTGTTTTCCCCNNANGNGCAAGCATTACCGCTTGTG
GGTCACTTCTCTTCCCCAAGGGGTCAACTATTACGCTTATGTAAAGCCAGTATAAGCGCCG
GACGNNTTAGTCGATGGAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCTGCCGNAAT
CGCTGAAATGGGAGATCGTATGATTTCCCCAACAGNGNAAGCATTACCGCTTGTGN

Reverse

GCCTGTTGNNNNACATANGAACNATACTTGTNTGNTTCCATGCGATNGAGCGAACGTAGCTT
GTCCTGGCTTTACGTATCCGTAATAGTTGATCACAGATCCGTAGGGAAGTAACGTTTTTACG
GTTTCGTTTGTCCCTGGNANTGTGTCCTCGCTCAGAACAAAAGAGCTTTTATAGGCTTGGCAG
ACCACCGAAAGCACCACAAGCGGTAATGCTTGCCTGTTGGGGAAATCATACGAACCACAA
GCGGGAATGCTTGCCTGTTGGGGAAACCNACGAACNCCACGCGGANNGCTTGTGCTNT
TGGGGAAAACNCATGAGCACCCACG

Figura II.23. Exemplo da identificação de uma das sequências obtidas, correspondendo à espécie *Leptospira interrogans* (serovar Icterohaemorrhagiae).

7 Discussão e Conclusões

Como anteriormente referido a leptospirose é um problema emergente de Saúde Pública a nível mundial, com especial impacte nas regiões tropicais. O clima húmido, a ocorrência de elevados níveis de precipitação, e o frequente défice em saneamento básico, constituem condições que expõem as populações destas regiões a elevado risco de contacto com leptospiros.

Ao contrário do que acontece noutros continentes onde a leptospirose é conhecida, diagnosticada e notificada (recorda-se que na maior parte dos países esta doença infecciosa de etiologia bacteriana é de notificação obrigatória, como acontece, por exemplo em Portugal, desde 1950, para leptospiros do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* e a partir de 1987 para todas as leptospiros patogénicas), a situação epidemiológica no continente Africano, de acordo com as publicações disponíveis (WHO, 2003; Holt *et al.*, 2006), é ainda pouco conhecida ou até totalmente ignorada.

Na década de 80 do século passado, a investigadora Margarida Collares-Pereira e colaboradores, já admitiam a existência da leptospirose humana na Guiné-Bissau (Collares-Pereira & Baptista, 1992), muito embora o conhecimento biológico das leptospiros nos reservatórios silváticos fosse inexistente à data do início do presente estudo. O conhecimento dos serovares e os respetivos reservatórios/hospedeiros em cada região é, no entanto, primordial para a compreensão da epidemiologia da doença nessa região, uma vez que a prevalência de diferentes serovares na população humana de uma determinada região e/ou país, depende dos reservatórios animais aí presentes e dos serovares que estes possam veicular no ambiente (Bharti *et al.*, 2003).

Assim, realizou-se um estudo descritivo com recurso a dois métodos diretos para a deteção e posterior identificação de leptospiros nos rins dos roedores capturados e dissecados: a amplificação de DNA leptospírico por PCR, efetuada na totalidade das amostras em estudo e a cultura (para isolamento “*in vitro*”), efetuada aleatoriamente em 10% das amostras em estudo. Primeiramente, no entanto, houve lugar à observação e identificação do habitat das diferentes espécies de roedores em sete zonas representativas da cidade, determinadas pela existência de aglomerados humanos,

lixeiros, pontos de água, esgotos a céu aberto e armazéns de alimentos. De seguida procedeu-se à captura de exemplares vivos nos seus habitats. Para tal empregaram-se armadilhas manufaturadas em Portugal ou produzidas localmente, utilizadas de acordo com os procedimentos previamente descritos (Cardoso, 2009); a iscagem das armadilhas foi pré-testada de forma a corresponder às diferentes preferências alimentares dos roedores. A otimização da metodologia de captura de roedores efetuada neste trabalho para o contexto da cidade de Bissau poderá ser útil para futuros estudos deste tipo neste País.

A presente investigação teve um carácter inovador no contexto da Guiné-Bissau porque o seu principal objeto de estudo foram os roedores, que constituem de facto o principal elo da cadeia de transmissão das leptospirosas e assumem um papel crucial no ciclo silvático enquanto reservatórios naturais das referidas espiroquetas zoonóticas. Esta abordagem original procurou identificar e confirmar não só as genoespécies de *Leptospira* existentes nos roedores, como conhecer qual ou quais as espécies que maior papel têm na disseminação das mesmas em Bissau e áreas circundantes.

Dos 104 roedores incluídos no presente estudo, cerca de 29% revelaram a presença inequívoca de *Leptospira* spp, através da deteção do respetivo DNA. No que diz respeito às espécies dos roedores capturados, os resultados mostraram que qualquer uma das três espécies identificadas pode constituir um reservatório natural de leptospirosas na cidade de Bissau, uma vez que foi possível detetar DNA leptospírico nas três espécies. Em função da frequência de captura de cada uma das espécies, com a maior frequência a recair sobre *R. norvegicus* (67%), seguida dos roedores *M. musculus* (30%) e por último, dos roedores da espécie *R. rattus* cuja frequência foi estimada em cerca de 3%, pode obter-se uma estimativa da importância concreta do papel de cada uma das espécies na transmissão da leptospirose em Bissau.

Esta frequência de deteção de DNA leptospírico em roedores vai ao encontro dos resultados obtidos em Madagáscar em que num total de 268 animais capturados, os investigadores observaram uma taxa bacteriológica para *Leptospira* spp. da ordem de 34 a 54%. Esta variação seria, segundo os autores, devida às diferentes características das localizações (ex: rural *versus* urbano) em que decorreu o estudo (Rahelinirina *et al.*, 2010). Um outro estudo, mais recente, realizado em Kibera, uma área urbana

extremamente degradada de Nairobi, no Quênia (Halliday *et al.*, 2013) revelou uma taxa de positividade de 18.3% (41⁺/224), inferior à obtida no presente estudo. Explicações para esta diferença poderão residir tanto na estratégia de captura dos roedores empregada, como na existência de condicionalismos climáticos e ecológicos distintos entre Kibera e Bissau.

Convém salientar que muito embora os roedores sejam reconhecidos como os principais reservatórios das leptospirosas, em dois estudos efetuados em Cabo Verde e no Egito, analisando respetivamente 54 e 211 roedores, estas bactérias não foram identificadas nestes animais (Moch *et al.*, 1975; Sebek *et al.*, 1989). Este facto evidencia a importância de se efetuarem estudos suficientemente abrangentes e amplos de modo a confirmar o papel efetivo dos principais reservatórios/hospedeiros (roedores ou outros), destas bactérias de forma a poder obter um panorama real da epidemiologia da leptospirose no local em estudo e a poder implementar medidas eficazes de controlo. A deteção percentualmente significativa de uma taxa de infeção por espiroquetas do género *Leptospira* nos roedores, em todas as zonas da cidade de Bissau e arredores abrangidas pelo presente estudo, vem pela primeira vez confirmar claramente, as evidências obtidas no passado sobre a presença destas espiroquetas na Guiné-Bissau. Os nossos resultados indicam adicionalmente que os roedores deverão ser, pelo menos numa fase inicial, o principal alvo de medidas de controlo da leptospirose em Bissau.

No entanto, o reduzido número de animais capturados e analisados quanto à presença dos referidos agentes zoonóticos, a par da reduzida distribuição espacial do estudo, apenas permitiram confirmar, na presente investigação, o importante papel, como reservatórios, dos roedores das três espécies estudadas. A interpretação dos resultados obtidos face às características dos reservatórios (associação com o género, faixa etária, preferências ecológicas, entre outras) será mais consistente na sequência da obtenção de uma amostragem mais ampla nas áreas referenciadas neste estudo e eventualmente em mais regiões do país, como continuidade da presente investigação.

O presente estudo, através dos resultados percentuais para cada espécie de roedor, também reflete a estratégia de amostragem adotada. Assim, não surpreende que a espécie *R. norvegicus* tenha sido a mais abundante seguida dos roedores *M. musculus*, já que o esforço de captura de roedores foi feito em zonas que correspondem ao habitat

preferencial destas espécies. Assim, também o diminuto número de *R. rattus* capturado dever-se-á provavelmente às suas características de trepador (nomeadamente privilegiando a copa das árvores e os telhados das habitações) e a armadilhagem por nós implementada não ter incidido, em particular, neste tipo de habitat.

Também, quando se analisaram as frequências respeitantes aos animais em que foram detetadas leptospiros e se procurou perceber se o género (machos *versus* fêmeas) e o estágio de desenvolvimento (adultos *versus* juvenis) dentro de cada espécie e entre espécies, poderiam estar associados à capacidade de dispersão das bactérias na natureza, verificou-se que independentemente de se tratar de *M. musculus* ou de *R. norvegicus* (para referir apenas as duas espécies com maior número de animais capturados), foram as fêmeas adultas que apresentaram percentualmente o maior número de amostras positivas. No entanto, apesar desta evidência, não se verificou existirem diferenças estatisticamente significativas quer entre machos e fêmeas, quer entre roedores adultos e juvenis, no que respeita à presença de leptospiros nos mesmos. De facto, os dados apontam para taxas bacteriológicas muito próximas entre si, o que traduz provavelmente que qualquer das espécies apresenta igual probabilidade na dispersão das leptospiros no ambiente, facto que foi também já evidenciado em Portugal (Cardoso, 2009).

De qualquer modo, não podemos deixar de considerar que a dimensão da amostra analisada, por ser relativamente pequena pode, de alguma forma, introduzir um viés na presente análise. No entanto, não obstante esta limitação, entendemos que os dados obtidos não devem ser ignorados e que pode afirmar-se que os roedores estão a concorrer ativamente para a existência de leptospiros no ambiente e, por consequência, a constituírem um elo importante no risco de exposição para a população local, como é demonstrado por exemplo, no Bairro do Bandim1/caracol, onde quase metade (48%; 50⁺/104) do total da amostra em estudo, mostrou uma taxa bacteriológica significativa para *Leptospira* spp.

Outro aspeto que nos parece muito relevante é o facto de se ter observado uma alta positividade de taxa bacteriológica (67%) nos animais capturados no exterior das habitações. Este resultado, poderá estar relacionado, no nosso entender, com a degradação das condições sanitárias e de saneamento nos mercados, onde se realizou uma parte significativa (75%) das capturas. Estes locais são quase todos de terra batida

e neles são encontradas com frequência coleções de água, nas quais os feirantes e os clientes muitas vezes caminham descalços ou de chinelos, o que facilmente poderá propiciar o contacto com a urina dos roedores presumivelmente contendo leptospiiras viáveis. Assim, pode admitir-se que estes lugares, constituam potenciais focos de infecção por leptospiiras para os humanos que os frequentam, em resultado da conjugação das precárias condições de saneamento e da presença dos roedores. Mais ainda, uma vez que a grande maioria da população de Bissau utiliza estes mercados para o seu abastecimento diário em géneros alimentícios e outros bens de primeira necessidade, o seu papel na transmissão de leptospiiras aos humanos deverá ter um significado epidemiológico muito considerável. Ainda assim, a taxa de positividade dos roedores capturados no interior das habitações não é desprezível (33%), o que indica que esta população deverá ser também alvo de medidas de controlo, eventualmente até mais fáceis de implementar.

Importa salientar igualmente que os condicionalismos abióticos, nomeadamente, temperatura e humidade, conjugados com as deficientes condições de saneamento básico, e a disponibilidade em abundância de alimentos para os roedores nos mercados e nos armazéns, facilitam a proliferação dos mesmos nestes ambientes. Uma vez que a transmissão de leptospiiras depende da amenidade das temperaturas, a par de um elevado teor de humidade e das épocas chuvosas e de inundações, o que em conjunto constitui fatores condicionantes duma maior sobrevivência de leptospiiras patogénicas após a respetiva eliminação na urina do animal, pelo que se considera que estão presentes em Bissau condições ótimas que poderão constituir um risco permanente para o contágio humano, sujeito no entanto a variação sazonal, com eventual incremento na época chuvosa. Estratégias futuras de controlo da leptospirose em Bissau poderão ter vantagem em levar em conta esta potencial variação sazonal.

No que respeita à abordagem laboratorial do presente trabalho, importa referir que a técnica de PCR com os *primers* “hap 1”, específicos para leptospiiras patogénicas, mostrou ser um método rápido e relativamente simples. Tendo em vista estas vantagens a estratégia de utilizar em primeiro lugar os *primers* “hap 1” neste estudo revelou-se correta. Naturalmente, as abordagens poderiam ter sido outras e o trabalho laboratorial desenvolvido em condições mais favoráveis, se dispuséssemos de estruturas mais sofisticadas no local (Bissau). Este facto foi uma limitação à execução, em tempo útil,

de outras técnicas, nomeadamente culturais, que teriam permitido obter resultados mais robustos.

No entanto, em Lisboa, no Laboratório de Referência de Leptospirose (IHMT, UNL) foi não só possível executar a abordagem molecular acima referida, como ainda foi possível ter acesso a outra abordagem de PCR, com maior capacidade diagnóstica. Assim, os resultados positivos pelo protocolo “hap 1” foram confirmados com os *primers* “lipL32” através de um protocolo de *nested* PCR. Com a utilização deste, obteve-se um número superior de amostras positivas comparativamente com o primeiro protocolo “hap 1”. Estes dados confirmam a reconhecida importância de uma segunda amplificação (*nested*) na PCR pelo incremento do valor diagnóstico do teste como sugerido por Jouglard e colaboradores (2006) e confirmado por outros autores (Vieira *et al.*, 2006; Carreira, 2009).

Esta última abordagem, apesar de mais dispendiosa e complexa, constitui uma mais-valia que poderá também ser aplicada em estudos futuros, não só em roedores (tecido renal) como aplicada a outros produtos biológicos como o sangue e/ou soro de doentes onde se pretenda igualmente determinar se existe infeção por *Leptospira* spp. Esta abordagem pode assim ser de grande utilidade, por exemplo para complementar estudos de prevalência em doentes com suspeição clínica de leptospirose em fase leptospirémica (nos primeiros dias de infeção), nos quais a deteção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* se mostra insuficiente, como tem sido demonstrado em vários estudos nos últimos anos (Jouglard *et al.*, 2006; Carreira, 2006; Ndeynelao, 2013).

Por último, os resultados da sequenciação de 12 das 30 amostras em que foi amplificado DNA leptospírico, permitiram através da comparação com sequências conhecidas de *Leptospira* spp. depositadas no GenBank, determinar a existência dos serovares Icterohaemorrhagiae e Pomona, pertencentes respetivamente, às espécies genéticas *Leptospira interrogans* sensu stricto e *L. kirschneri*. Estes dados são de grande importância, por um lado, por serem os primeiros achados neste âmbito na Guiné Bissau, e por outro lado, por constituírem um estímulo para estudos futuros de leptospirose na população humana do país.

Estes resultados são de facto tanto mais pertinentes quanto se sabe que os serovares presentemente identificados pertencem a serogrupos associados, desde há muito, aos

casos mais severos da doença; de facto, as leptospiros do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* são reconhecidamente responsáveis pela doença de Weil, e estão por sua vez diretamente relacionadas com os roedores da espécie *Rattus norvegicus*, como demonstrado por diversos estudos (Collares-Periera, 1992, Faine, 1999; Levett, 2001; Bharti, 2003), entre outros autores.

Uma referência ainda para o exame cultural que, como se sabe, é o método por excelência em bacteriologia e a prova inequívoca da presença das bactérias que se pretende estudar, no caso do presente estudo, as leptospiros. É, por isso, considerado um método fundamental na avaliação do papel dos roedores como reservatórios de leptospiros, fornecendo só por si evidências epidemiológicas robustas sobre a leptospirose numa determinada região ou país, sendo por isso, o método recomendado para o estudo de populações animais, com o objetivo de conhecer-se a prevalência de portadores assintomáticos de leptospiros (Collares-Pereira, 1994).

A eficácia do método cultural depende entre outros aspetos, de condições ótimas de conservação do material a cultivar e de autólise tecidular reduzida, o que significa que deve ser utilizado muito precocemente após colheita da amostra. Também se sabe que a gravidade da leptospirose está associada, entre outros fatores, a determinadas estirpes com capacidade de induzir formas mais ou menos severas da doença, como é o caso de serovares do serogrupo *Icterohaemorrhagiae*, conhecidos pela sua patogenicidade e virulência (Levett, 2001), pelo que a obtenção de isolados constituiria, um ganho epidemiológico essencial, para a identificação dos serovares infetantes assim como as espécies de roedores a eles associados.

No presente estudo e até à data em que se preparava este manuscrito não foi obtido qualquer isolado de *Leptospira*, o que poderá estar relacionado com presença de contaminantes na amostra, ou a uma baixa concentração de leptospiros viáveis no inóculo inicial; no entanto, a razão mais plausível para ausência de crescimento verificada no nosso estudo (até ao presente) deverá estar relacionada com o facto das sementeiras em meio seletivo terem sido feitas a partir de amostras previamente congeladas e transportadas da Guiné-Bissau para Portugal (Lisboa).

Pese embora o facto de as leptospiros poderem sobreviver à congelação, desde que adaptadas ao meio de cultura, em termos de exame cultural o ideal é processar as

amostras a fresco, logo que obtidas. Assim, os fatores supramencionados aliados ao facto de, por razões logísticas, apenas 10% do total das amostras terem sido cultivadas, deverão ter contribuído para diminuir a probabilidade de obtenção de isolados de *Leptospira* por esta técnica. Esta ausência de positividade pelo método cultural não deve no entanto, deixar de considerar-se que, face aos resultados obtidos nas abordagens moleculares, os roedores objeto do estudo, sejam efetivamente portadores renais crónicos de leptospirosas.

Globalmente, diríamos que a metodologia utilizada neste estudo mostrou-se adequada às limitadas condições técnicas disponíveis no terreno e permitiu:

- Determinar a taxa de infeção por leptospirosas patogénicas numa amostra de roedores;
- Confirmar o importante papel dos roedores como reservatórios da bactéria e potenciais transmissores de leptospirose;
- Descrever algumas das características ambientais e ecológicas suscetíveis de contribuírem para humanos e outros animais.

Adicionalmente, a demonstração feita neste estudo da existência de serovares de leptospirosas considerados altamente virulentos e patogénicos para humanos deveria ajudar a estabelecer claramente a necessidade de inclusão da leptospirose no diagnóstico diferencial de doentes com quadro clínico febril de etiologia indeterminada. De posse desta informação relativa aos serovares circulantes podem ser produzidos testes rápidos e adequados ao diagnóstico, o que certamente contribuiria para uma correta intervenção clínica destes doentes.

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam vir a contribuir para a implementação de um plano de controlo de roedores, que inclua medidas de prevenção, medidas corretivas e medidas de eliminação. Dadas as difíceis condições socioeconómicas que se vivem em Bissau, reconhece-se que um tal programa não será fácil de implementar, mas a sua necessidade é evidente não só no que respeita à leptospirose mas também a várias doenças causadas por outros agentes etiológicos também transmitidas por roedores, cujo controlo é fundamental para a saúde pública.

O presente estudo é pois, um marco epidemiológico, ao evidenciar pela primeira vez a infecção leptospírica em roedores na Guiné-Bissau. Um conhecimento mais completo da leptospirose, incluindo aspetos epidemiológicos básicos e a respetiva importância em termos de impacto na saúde humana na cidade de Bissau e arredores está ainda longe de ser atingido. No entanto, acreditamos que os resultados agora obtidos possam: *i)* constituir uma contribuição significativa para a compreensão da importância desta zoonose em Bissau; *ii)* consolidar as evidências disponíveis em estudos anteriores, efetuados décadas atrás em humanos; *iii)* expandir os conhecimentos sobre os roedores como reservatórios importantes de leptospirosas patogénicas; e *iv)* apontar a necessidade premente de mais e melhores estudos sobre esta doença na Guiné-Bissau, em prol da saúde dos seus habitantes.

8 Referências Bibliográficas

Adler B. & de la Peña-Moctezuma A. (2009). *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol, 140 (3-4): 287-96. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345023>. [Acedido em 28 Fevereiro 2013].

Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano PML. (1994). Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental, em localidade urbana da região sul do Brasil. Rev Saúde Pública, 81(28):76.

Avila-Pires, FD de. (2006). Leptospirose e enchentes: uma falsa correlação? Rev Patol Trop, 35: 3-6.
Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/1880>
[Acedido em 2 de maio 2013]

Barcellos CP. (2001). The place behind the case: Leptospirosis risks and associated environmental condition and a food related outbreak in Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública, 67: 7-59.

Bertherat EA, Renaut, R. Nabias G, Dubreuil MC, Courbot G.(1999). Leptospirosis and Ebola virus infection in five gold-panning villages in northeastern Gabon. The Am J Trop Med and Hyg, 60(4):610-5.
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348236>. [Acedido em 24 de Janeiro 2013].

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias MA, Diaz MM, Levett MA. (2003). Reviews Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infec Dis, 3: 757-71.

Branger ., Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, Fontaine G A, (2001). Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. Infec and Immunity, 69(11): 6831-38. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=100061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> , [Acedido em 13 Fevereiro, 2013].

Cardoso, M. das N.M.M.P., (2009). Importância Epidemiológica dos Roedores como Reservatórios de *Leptospira* em Explorações Pecuária de Gado Maronês na Região de Trás-os-Montes. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, 272 pp.

Collares-Pereira M, Baptista J, Rocha LC. (1992). Leptospirose na Guiné Bissau Inquérito Sorológico. Rev Port Doenç Infec, 15(1): 19-24.

Collares-Pereira M. (1994). *Leptospira* e Leptospirose: Epidemiologia e Diagnóstico Laboratorial. Cad de Doen Infec, III:19-28.

Crespo A. (2012). Controlo de Pragas no Jardim Zoológico de Lisboa - Particular Relevância Para o Controlo de Roedores e Sua Infecção Parasitária. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 158 pp.

Cunningham D. & Moors PJ. (1996). Guide to the identification and collection of New Zealand rodents New Zealan., Wellington.

Faine, Adler B, Bolin C, Perolat. (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd Edition A. MediSci Writing, Armadela Vic,ed., Melbourne Australia, 236 pp.

Felt SA, Wasfy MO, El-Tras WF, Samir A, Rahaman BA, Boshra M. (2011). Cross-Species Surveillance of *Leptospira* in Domestic and Peri-Domestic Animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. Am J Trop Med and Hyg, 84(3): 420-25. [Acedido em 7 Fevereiro, 2014]

Figueredo CM, Moraes AC, Oliveira MAA, Alves WR, Coteman MC, Chamone CBE, Kairy M. (2001). Leptospirose humana no município de Belo Horizonte minas Gerais uma abordagem geográfica. Rev Soc Bras Med Trop, 338: 34-331.

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML. (2013). First isolates of *Leptospira* spp from rodents captured in Angola. Comunicação oral no “8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society”Fukuoka, Japão, 8-11 Oct’ 2013. In Proceedings of the Meeting.

FUNASA. (2002). Manual de Controle de Roedores. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Brasília Ed. Assessoria de comunicação e educação em saúde / Ascom /FUNASA, Núcleo de Editoração e Mídias de Rede, Brasil.

Garcia JVS. (2011). Contribuição para o conhecimento da leptospirose humana na região do Lobito (Angola): Aplicação de métodos de diagnóstico Serológico e molecular. Dissertação de Mestrado em Saúde Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 58 pp.

Gonçalves, ATS. (2009). Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa, 114 pp.

Halliday, JEB, Knobel DL, Allan BM, Bronsvoort BMC, Handel I, Agwanga B. (2013). Urban leptospirosis in Africa: a cross-sectional survey of leptospira infection in rodents in the Kibera urban settlement, Nairobi, Kenya. The Am J Trop Med and Hyg, 89(6): 1095-102. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=de3854886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. [Acedido em 23 Janeiro, 2014].

Jobbins SE, Sanderson CE& Alexander KA. (2013). *Leptospira interrogans* at the Human-Wildlife Interface in Northern Botswana: A Newly Identified Public Health Threat. Zoonoses and Public Health. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672285>. [Acedido em 7 de Fevereiro 2014].

Johnson RC & Rogers P. (1964). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. J Bacteriol, 88: 1618-23. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=277463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. [Acedido em 7 de Fevereiro 2014].

Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassy F. Dellagostin AO. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. Can J Microbiol, 52(8):747–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917533> [Acedido em 13 de Fevereiro 2014].

Laurent G & Duplantier JM. (2009). Les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanienne IRD Éditio. P. S. du Muséum, ed., Marseille.] Disponível em: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010048662>. [Acedido em 13 de Fevereiro 2014]

Levett PN. (2001). Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, 14(2): 296-326.

Levett PN & Smythe L. (2008). International Committee on Systematics of Prokaryotes. Int J Syst and Evol Microbiol, 58:1049-50.

Mgode GF, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Harstkeerl R. (2006). New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. Int J Syst and Evol Microbiol, 56(3):593-97. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. [Acedido em 26 de Fevereiro 2012].

Ndeyanelao EGE, (2013) Leptospirose Humana na Província de Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes assistidos no Hospital Central Dr. António Agostinho Neto, Lubango (Angola). Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 126 pp.

Ngbede EO, Raji MA, Kwanashie CN, Emmanuell OC, Maurice AN. (2012). Leptospirosis among zebu cattle in farms in Kaduna State, Nigeria. Asian Pac J Trop Dis, 2(5): 367-69. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2222180812600802>. [Acedido em 26 de Fevereiro 2014].

Oliveira D. (2009). Desigualdades intraurbanas de leptospirose no Recife. Tese de Doutorado.Fundação Oswaldo Cruz.

Picardeau M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43(1): 1-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337900>. [Acedido em 5 de Fevereiro 2014].

Plank R & Dean D., (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infec*, 2(10):1265-76. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01280-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01280-6). [Acedido em 5 de Janeiro 2014].

PNDS II, M da S.P., (2008). Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário II - Guiné-Bissau,

Rahelinirina S, Léon A, Harstkeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C. (2010). First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PloS One*, 5(11):.e14111. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2991340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. [Acedido em 30 de Janeiro 2013].

Randall C. (2001). General Pest Control 10a General Pest Control: A Guide for Commercial Applicators M. State University Extension, ed., Michigan.

SRAFAM (DSAP), (2012). Manual de boas práticas de controlo de roedores na região autónoma nos Açores .

Sarkar U. (2002). Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(5), pp.605–10. [Acedido em 30 de Janeiro 2013] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12201599>.

Silva BDA. (2010)- Urbanização na Guiné-Bissau, morfologia e estrutura urbana da sua capital, Dissertação de Mestrado em Urbanismo, Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias, Lisboa, 111 pp.

UNPD, (2013). United Nations Development Programme - Relatório do Desenvolvimento Humano 2013.

Vieira ML. (2006). Aspetos da Caracterização Antigénica e Molecular da Leptospirose em Áreas Endémicas. Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 301 pp.

Vijayachari P, Sugunan AP & Shriram AN. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J of Biosc*, 33(4): 557-69. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208981>. [Acedido em 11 de Fevereiro 2014].

WHO/ILS, (Word Health Organization / International Leptospirosis Society). (2003), Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. 122 pp.

Wun-Ju Shieh, Charles E, Levett PN. (2006). Leptospirosis. In Elsevier/Churchill Livingston, Philadelphia, ed. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice, 2nd Edition. Churchill Livingstone: Elsevier/Churchill Livingston, Philadelphia, iii + 1721 pp.

Yasuda PH. (1987) . Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. Int J Syst Bacteriol, 37(4): 407--15. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/37/4/407.abstract?sid=546c02a4-bfff-4a7f>. [Acedido em 7 de Fevereiro 2014].

Zaki SR & Shieh WJ. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. Lancet, 347: 535–36. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596276> [Acedido em 1 de Maio 2013].

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I – Declaração do Comité Nacional de Ética em Saúde da Guiné-Bissau



Comité Nacional de Ética na Saúde

DECLARAÇÃO DE PORTE

Para os devidos efeitos declara-se que as amostras recolhidas pelo **Sr. Baltazar Cá** destinam-se exclusivamente à realização do projeto de investigação promovido pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, no âmbito do III Mestrado de Saúde Tropical, denominado "*Importância Epidemiológica das Roedores como reservatórios da Leptospira spp na cidade de Bissau (Guiné-Bissau) e áreas limítrofes*".

Mais se declara que o Comité Nacional de Ética na Saúde, do Ministério da Saúde Pública, aprovou o referido estudo e autoriza o transporte das mesmas amostras, não tendo qualquer valor comercial e nem constituindo qualquer risco para Saúde Pública.

Feito em Bissau, aos sete dias do mês de Agosto de dois mil e treze.

O Presidente

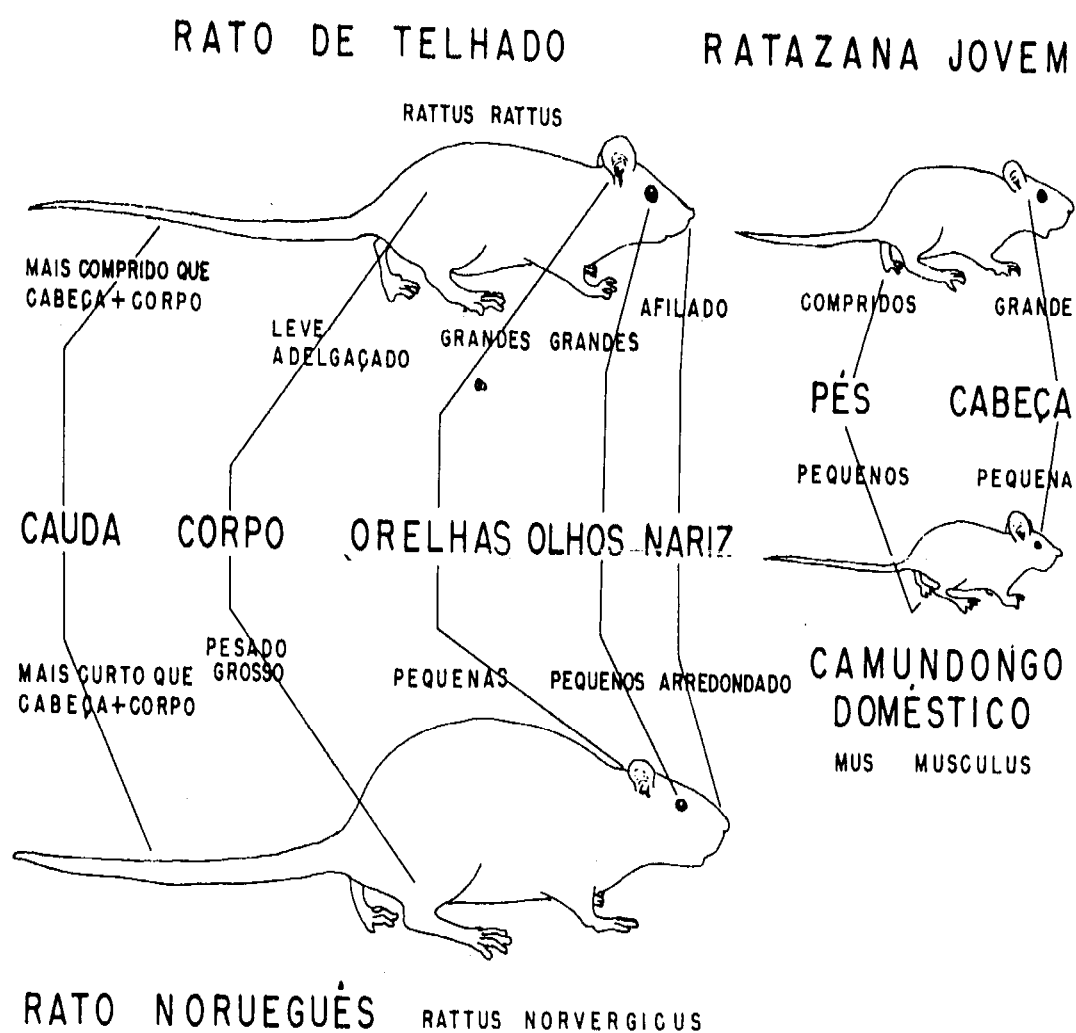
Dr. Cunhate Na Bangna



ANEXO II - FICHA DE RECOLHA DE DADOS

Nº ORDEM	DATA CAPTURA	ZONA CAPTURA	GÉNERO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS					
				CABEÇA + CORPO	CAUDA	ORELHA	PATA POSTERIOR	PESO	OBS

Anexo II (cont.) - Características Morfológicas de : *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*



Adaptado da Guia de controlo de roedores (FUNASA-2002)

Tabela: Resumo das principais características e comportamentos das três espécies em estudo

Comportamento e Características	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>M. musculus</i>
Peso	150 g a 600 g	100 g a 350 g	10 g a 21g
Corpo	Robusto	Esguio	Esguio
Comprimento Corpo + Cabeça	22 cm	20 cm	9 cm
Cauda	16 cm 25 cm	19 cm a 25 cm	7 a 11 cm
Orelhas	Relativamente pequenas, normalmente meio inseridas no pelo: 20 mm a 23 mm	Grandes e proeminentes, finas sem pelo: 25 mm a 28 mm	Proeminentes, grandes para o tamanho do animal: 10 mm
Focinho	Arredondado	Afilado	Afilado
Habitat	Tocas e galerias no subsolo, perto de esgotos, lixeiras interior de instalações, mais comuns fora de habitações	Forros sótãos, paióis, silos e armazéns podem viver em árvores, mais comuns no interior de edifícios	No interior de móveis despensas armários, geralmente no interior de edifícios
Habilidades físicas	Hábil nadador, cava tocas	Hábil trepador raramente cava tocas	Hábil trepador pode cavar tocas
Raio de Ação	Cerca de 50 m	Cerca de 60 m	Cerca de 3 m a 5 m
Alimentação	Omnívoro, prefere grãos, carnes ovos e frutas	Omnívoro, preferência por legumes frutas e grãos	Omnívoros, preferência por grãos e sementes
Neofobia	Marcada neofília a locais poucos movimentados	Apresentam marcada neofobia	Possuem hábitos exploratório (neofilia)
Gestação	22 a 24 dias	20 a 22 dias	19 a 21 dias
Ninhadas /ano	8 a 12	4 a 8	5 a 8
Filhotes / ninhada	7 a 12	7 a 12	3 – 8
Desmane	28 dias	28 dias	25 dias
Maturidade sexual	60 a 90 dias	60 a 75 dias	42 a 45 dias
Vida média	24 meses	18 meses	12 meses

Anexo III - Protocolo de necropsia

Objetivo: Necropsiar e extrair órgãos de roedores

Equipamentos e consumíveis (reagentes, material biológico, e material descartável):

- Incubadora orbital
- Bico de Bunsen
- Prancha de disseção e alfinetes
- Tesoura
- Pinça
- Bisturi
- Éter
- Betadine[®] solução
- Algodão
- Sacos de plástico
- Pipetas de Pasteur

Descrição da técnica:

1. Anestesiado o roedor introduzindo-o num recipiente fechado contendo o algodão embebido de Isoflurano
2. Colocar o animal numa prancha de disseção e distende-lo com ajuda de alfinetes;
3. Desinfetar a região ventral com alagadão embebido no betadine
4. Retirar a camada epitelial superior e distendê-la com alfinetes;
5. Desinfetar uma tesoura e pinça passando-as por álcool e pela chama
6. Retirar os dois rins e, pontualmente, outros órgãos tais como baço ou fígado.
7. Colocar a material colhido num tubo de conservação e proceder ao congelamento (-60°C).

Anexo IV - Preparação do meio de cultura EMJH

Objetivo: Preparação de meios de cultura seletivos para isolamento e crescimento de *Leptospiras*.

- Câmara de fluxo laminar e Bico de Bunsen
- Dispensador automático (autoclavado)
- Autoclave
- Meio base EMJH (Difco[®])
- Suplemento para meio selectivo EMJH (Difco[®])
- Caldo nutritivo (Difco[®])
- 5-Fluorouracilo (5-FU) (Sigma[®])
- Soro de coelho
- Água destilada
- Tubos de vidro estéreis – 16x16 mm (Schott Duran[®])
- Frascos de 1 Litro estéreis (Schott[®])
- Filtros de 0,8 µm, 0,45 µm e 0,22 µm
- Seringas de 20 ml

1. Meio de EMJH

(meio seletivo enriquecido utilizado nas fases de isolamento inicial de *Leptospira* spp.)

- 1.1 Dissolver 1,8 g de Agar e 2,3 g do meio base EMJH (Difco[®]) Em 900 ml de água destilado.
- 1.2 Autoclavar a 120°C durante 15 minutos;
- 1.3 Adicionar 100 ml, do suplemento (Difco[®]), 20 ml de soro de coelho (Gibco[®]) inativo a 56°C e 10 ml de 5-FU (filtrado) (10mg/ml) em câmara de fluxo laminar previamente, esterilizado.
- 1.4 Distribuir aproximadamente 4ml por cerca de 250 tubos estéreis á chama em câmara de fluxo laminar.

2. Soro de coelho

(Componente nutritivo suplementar adicionado ao meio EMJH semi – sólido, e por vezes ao meio líquido para algumas estirpes de referencia)

2.1 Aquecer o soro de coelho, (Gibco[®]) a 56°C em banho-maria durante 45 minutos.

2.2 Deixar arrefecer á temperatura ambiente e filtrar o soro de coelho com filtro estéril de 0.8 µm e depois com filtro de 0.45 µm.

2.3 Preparar alíquotas de 20ml em tubos estéreis e congelar a -20°C

3. Fluorouracilo (5-FU) (10 mg/ml)

Antimicrobiano/análogo pirimidínico a adicionar ao meio de EMJH semi-sólido

3.1 Dissolver uma 1g de 5-fluoruraciloem 50 ml de água destilada.

3.2 Ajustar o pH a 7,6 com NaOH e perfazer o volume de (100 ml) com água destilada.

4. Meio de EMJH Líquido

(meio de cultura seletivo para Leptospira spp)

4.1 Dissolver 2,3 g de meio base (Difco[®]) em 900 ml de água autoclavado

4.2 Autoclavar a 120°C durante 15 minutos ;

4.3 Adicional 100 ml do suplemento (Difco[®]), em camara de fluxo laminar previamente esterilizada;

4.4 Distribuir 4 ml por 250 tubos estéreis á chama em Câmara de fluxo laminar.

5. Caldo nutritivo

(Utilizado como controlo de qualidade em teste de esterilidade ao meio EMJH/37°C/72h)

5.1 Dissolver 8 g de nutriente broth (Difco[®]), em 1 litro de água destilado;

5.2 Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;

5.3 Distribuir 4 ml por 250 tubos estéreis em câmara de fluxo laminar.

Anexo V – Protocolo para as culturas de rim

1. Colocar o rim num saco de plástico estéril (já preparado previamente), contendo 10ml (ratinhos) ou 20ml (ratazanas) de *Leptospira* Enrichement EMJH (BD DifcoTM). Este processo deve ser feito junto à chama (em ambiente mais estéril).
2. Colocar o saco num suporte e tapado por um pano escuro.
3. Deixar repousar o macerado do rim durante aproximadamente 2 horas (mínimo 1 hora), pois as leptospiros são aeróbias e têm tendência a migrar para a superfície do meio.
4. Junto à chama, retirar com uma pipeta descartável uma porção de sobrenadante para um tubo de EMJH líquido (2.5ml), designado de (-1).
5. Agitar (-1) e proceder de imediato a uma segunda diluição em EMJH líquido (2.5ml) designado de (-2). Deixar o tubo (-2) tapado com um pano escuro e a repousar pelo menos 1 hora.
6. Junto à chama, agitar (-2) e realizar a sementeira de algumas gotas (6/8 e 10/12 gotas) em dois tubos de EMJH sólido (A e B respetivamente).
7. Incubar os tubos A e B com agitação a 30°C (estufa). Após 24h e diariamente verificar o estado da cultura e agitar.

Anexo VI - Extração e purificação de DNA (Citogene[®]Tissue Kit)

Objetivo: obter amostras de DNA com elevado grau de pureza

- Camara de fluxo laminar
- Termobloco
- vortex
- Centrifuga
- Banho-maria
- Micropipetas
- Soluções do Kit Citogene[®]
- Água autoclavada
- Caixas de pontas estéreis com filtros
- Tubos *ependorf*[®] de 1,5 ml (estéreis)

Descrição da técnica

1. Etapa de lise Celular

1. Cortar com rapidez as amostras de tecido dos rins efetuar os processos rapidamente e manter sempre o tecido em gelo, incluindo durante a pesagem.
2. Colocar 1-5 mg de tecido renal num tubo de 1,5 ml contendo 150µl de **Cell Lysis**. Retirar do gelo e homogeneizar bem, com ajuda de um triturador para microcubos. Colocar novamente em gelo até ao passo seguinte.
3. Incubar o lisado a 65° C durante 15 minutos. Caso seja necessário um máximo rendimento adicionar 0,75µl de **Proteinase K** (20mg/ml) ao lisado. Misturar invertendo 25 vezes e incubar a 55°C durante a noite ate que as partículas se dissolvam. Se possível, inverter o tubo periodicamente durante a incubação.

2. Tratamento com RNase

1. Adicionar 0,75µl de solução de RNase A ao lisado Celular.
2. Misturar a amostra, invertendo o tubo 25 vezes. Incubar a 37°C durante 15-60 min
3. Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.

3. Precipitação Proteica

1. Adicionar 50 µl da solução **Protein Precipitation** à amostra
2. Agitar no vórtex a velocidade elevada durante 20 segundos para misturar uniformemente a solução **Protein Precipitation** com o lisado celular.
3. Centrifugar durante 3 min a 13-16.000g para formar um pellet compacto de proteínas . se o pellet não for visível, repetir o passo 2.5, seguida por incubação em gelo durante 5 min a seguir repetir o passo 2.6.
4. Decantar o sobrenadante contendo o ADN para um tubo de 1,5 ml contendo 150 µl de Isopropanol a 100%. Caso se espere um rendimento baixo (<1µg) adicionar 0,5µl de Glicogénio aos 150µl de Isopropanol.
5. Misturar a amostra invertendo cuidadosamente 50 vezes.

4. Precipitação de DNA

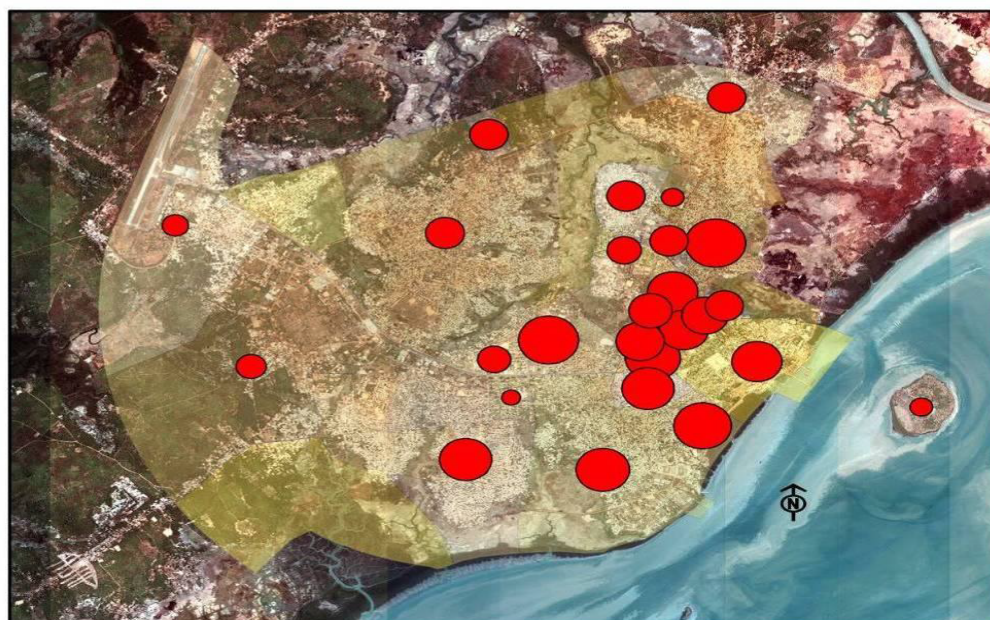
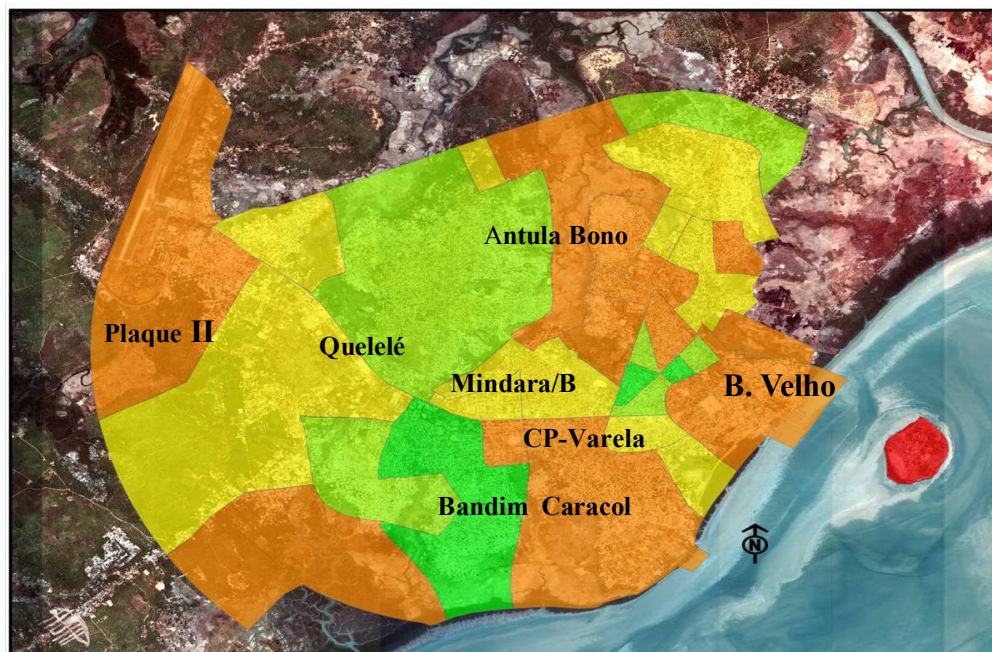
1. Centrifugar 5 min a 13-16.000g.
2. Deitar fora o sobrenadante e escorrer com cuidado o tubo para o papel absorvente, adicionar 150µl de etanol a 70% e inverter os tubos várias vezes para lavar o pellet de ADN.
3. Centrifugar 1 minuto a 13-16.000g. Deitar fora o etanol com cuidado, pois o pellet pode estar solto.
4. Inverter e escorrer o tubo em papel absorvente e deixar secar ao ar durante 10-15 min.

5. Hidratação do DNA

1. Adicionar 30µl de DNA Hydration a cada tubo (30µl proporcionara uma concentração de 50 ng/µl se o rendimento for de 1,5 µg de ADN

2. Incubar as amostras a 65°C durante uma hora ou durante a noite a temperatura ambiente. Guardar o ADN A 4°C. Para armazenar durante longos períodos, guardar a -20°C ou a -80°C.

Anexo VII : Mapas de Bairros em estudo

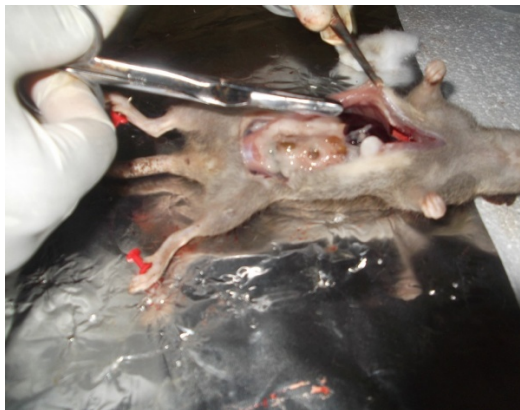


Adaptado de Silva (2010)

Anexo VIII – Trabalho de campo – Registo fotográfico



(fotos do autor)



(fotos do autor)



(fotos do autor)



(fotos do autor)