



# Universidade Nova de Lisboa

## **Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular**

Joana Vanessa Sequeira Garcia

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM SAÚDE TROPICAL

(DEZEMBRO, 2011)

Orientador: Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira

Co-Orientador: Professor Doutor Jorge Atouguia

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical, realizada sob a orientação científica da Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira

## AGRADECIMENTOS

---

Agora concluída a minha dissertação de mestrado, quero manifestar a minha gratidão a todas as pessoas que fizeram parte integrante deste trabalho. A sua ajuda foi imprescindível na realização deste projecto de investigação.

À Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, Directora do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme – Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço todo o seu apoio e ensinamentos. O facto de ter acreditado no projecto desde o princípio e a empatia que demonstrou com a minha pessoa, devido às dificuldades que surgiram durante todo o estudo, proporcionaram-me confiança e incentivo para a sua concretização. O seu conhecimento e ensinamentos permitiram que eu fosse uma melhor aluna e profissional, e por isso agradeço-lhe do fundo do meu coração. Devo, também, agradecer todo o empenho e dedicação que colocou na orientação da minha tese.

Ao Professor Doutor Jorge Atouguia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço em especial o acompanhamento prestado na preparação dos trabalhos, nas decisões, e pela amizade que demonstrou pela minha pessoa desde o princípio.

Uma palavra especial para o Dr. Paulo Cachimbombo, Director do Hospital Geral do Lobito e ao Senhor Administrador Frederico Valério do mesmo Hospital, agradeço por tornarem possível este estudo. As suas mentalidades inovadoras e empreendedoras para as suas comunidades permitiram e irão permitir mais cuidados de saúde para a região do Lobito. Foram pessoas excepcionais durante todo o percurso do projecto, não só por acreditarem nele, como também por o apoiarem com os poucos recursos que tinham. Acredito que serão profissionais que irão fazer a diferença em Angola.

Devo agradecer em particular à Dra. Bernise Narciso, ao Dr. Ramón, à Dra. Rosana, à Dra. Joana e à Dona Maria José (Chefe do Laboratório de Análises Clínicas) por todo apoio e interesse manifestado pelo estudo. A todos os médicos,

enfermeiros e técnicos de enfermagem que me ajudaram e me fizeram sentir em casa, o meu mais sincero obrigada.

Ao Doutor Filomeno Fortes agradeço pela sua gentileza em facilitar o processo de entrada no País e em aligeirar as comunicações com o Departamento de Saúde Pública Angolana. À Dra. Elisa Miguel, Supervisora nacional do Controlo da Malária, agradeço o apoio e interesse demonstrado pelo trabalho através da cedência de *kits* rápidos para detecção de Malária e redes mosquiteiras para serem oferecidas aos Centros de Saúde que participaram no estudo. Agradeço também ao Director Provincial Dr. Valentino Caliegue, Chefe de Departamento de Saúde Pública da Província de Benguela e ao Dr. António Cabinda, da Direcção de Saúde de Benguela, pelo apoio e ajuda prestados no processo de integração nas equipas médicas dos Centros de Saúde. Ao Dr. Edgar, Dr. Nelson e o Técnico Casiano agradeço todo o apoio durante a minha estadia.

Às minhas colegas do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Mestre Teresa Carreira, Mestre Mónica Nunes, Rosa Branca, Elsa Fortes e a Assistente Operacional Céu Mateus, que me ajudaram na realização dos trabalhos, mas também a ultrapassar todas as dificuldades que surgiram. Agradeço com grande estima a vossa amizade.

Por último, gostaria de ter uma palavra especial aos meus Pais pelo seu apoio incondicional e confiança, não só durante esta fase académica, mas durante todo o meu percurso. À minha Mãe, Esperança Sequeira, que sempre compreendeu as minhas opções e me aconselhou em toda a minha vida a fazer e seguir o que gosto. Ao meu Pai, Jorge Garcia, que tão pacientemente assistiu às minhas dificuldades na realização deste projecto e que tanto me apoiou. A fé e confiança que teve em mim pois permitiu que tivesse sido realizado com sucesso e, por isso, estou-lhe sinceramente grata.

Parte dos resultados incluídos nesta Dissertação foram apresentados sob a forma de *poster* na sessão temática “*Health Microbiology and Biotechnology*” do Congresso de Microbiologia, MicroBiotec’11, organizado pela Sociedade Portuguesa de Microbiologia e Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, que teve lugar na Universidade do Minho, Braga, 1-3 Dez’2011.

**Joana Vanessa Garcia**, Teresa Margarida Carreira, Jorge Atouguia, Maria Luísa Vieira. (2011). First identification of *Leptospira interrogans* sensu lato in patients of Lobito Region (Angola). In Abstracts Book of Microbiotec’11, pag. 190-1.

## RESUMO

---

### **Contribuição para o conhecimento da Leptospirose Humana na Região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular**

Garcia, Joana

Palavras-chave: Leptospirose, MACROlepto, TAM, Epidemiologia, Angola

A Leptospirose é um problema emergente na Saúde Pública, devido às suas proporções epidemiológicas e pelo aumento da incidência da doença em países industrializados e em desenvolvimento (Meites *et al.*, 2004). A doença tem uma ampla distribuição geográfica e ocorre com maior frequência nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas (Vijayachari *et al.*, 2008). Contudo, em algumas regiões desconhece-se a verdadeira prevalência, sendo reportada através de surtos esporádicos (Pappas *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas inespecíficas da infecção podem ser subdiagnosticadas nas regiões tropicais, onde as doenças febris são comuns e onde podem ser confundidas com doenças mais conhecidas como a Malária, Hepatite Viral, Dengue e outras.

Em Angola, o diagnóstico é realizado apenas através da história do paciente e suspeita clínica, dando origem a diagnósticos pouco precisos. Deste modo, é importante o uso de métodos laboratoriais, especialmente testes serológicos específicos, para a confirmação do diagnóstico clínico (Levett, 2001).

O objectivo principal deste estudo foi investigar a ocorrência de Leptospirose humana em Lobito (Província de Benguela) e identificar os serovares circulantes de *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.), utilizando técnicas serológicas e moleculares.

Entre Abril e Junho de 2011, após o necessário consentimento informado, fez-se um inquérito clínico-epidemiológico a 141 pacientes (64 homens e 77 mulheres) assistidos no Hospital Geral do Lobito, por cefaleias e febre com diagnóstico desconhecido, dos quais se colheram 141 amostras séricas e 36 amostras de urina.

A avaliação serológica foi inicialmente feita no laboratório local através da Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (MACROLepto) – teste de rastreio - e, posteriormente confirmada pela Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) - teste de referência - realizado no Laboratório de Leptospirose (IHMT, em Lisboa). Para a detecção de DNA de *Leptospira* utilizou-se a Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) com *primers* baseados no gene *hap 1*. Procedeu-se ainda à sequenciação dos produtos da PCR.

As principais manifestações clínicas foram: cefaleias (73,8%), febre (65,2%), mialgias (41,1%) e náuseas (33,3%). Dos dados epidemiológicos observou-se que 131 dos pacientes tiveram contacto com os principais reservatórios de leptospirosas, os roedores, e 76 ingeriram água não potável.

Os resultados serológicos revelaram no teste MACROLepto: 14 (10%) amostras positivas e 18 (13%) não-conclusivas, sendo os serogrupos Icterohaemorrhagiae (Copenhageni), Australis (Bratislava) e Sejroe os mais comuns. Destas amostras, cinco, foram confirmadas pela TAM (presença de aglutininas anti – *L. interrogans* s.l.). Paralelamente, o DNA de *Leptospira* foi detectado em 13<sup>+</sup>/81 (16%) das amostras séricas e numa amostra de urina. A sequenciação identificou os serovares Copenhageni e Lai, ambos pertencentes ao serogrupo Icterohaemorrhagiae da espécie genómica *L. interrogans*.

Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos pacientes, mesmo aqueles que praticavam actividades de menor risco epidemiológico, tiveram contacto com roedores e com águas não potáveis. O estudo também provou que a Leptospirose afectou sobretudo as mulheres adultas, admitindo-se que este achado possa ser comum noutras regiões do País. Por último, ficou demonstrada a existência de Leptospirose na região, o que poderá contribuir para a inclusão da doença na lista de doenças febris em Angola e noutros países tropicais.

## ABSTRACT

---

### **Contribution for the Human Leptospirosis knowledge in Lobito' Region (Angola): application of serological and molecular methods for diagnosis**

Garcia, Joana

Keywords: Leptopirosis, MACROlepto MAT, Epidemiology, Angola

Leptospirosis is an emerging public health problem, because of its epidemic proportions and increasing incidence in industrialized and developing countries (Meites *et al.*, 2004). The disease has a wide geographical distribution and occurs in tropical, subtropical and temperate zones (Vijayachari *et al.*, 2008). Although, in some regions, the real prevalence is unknown and only the outbreaks show its presence (Pappas *et al.*, 2007).

The nonspecific clinical presentation of the infection can lead to a misdiagnosis in tropical regions, where similar febrile illnesses are common and can be confused with disorders such as Malaria, Viral hepatitis, Dengue and others.

In Angola, the diagnosis is done only by the patient history and medical suspicion, which can follow to misdiagnosis. Thus, it is important to use laboratory methods for confirmation of the diagnosis, especially specific serological tests (Levett, 2001).

The aim of the study was to investigate the occurrence of human Leptospirosis in Lobito (Benguela Province) and identify the circulating species of *Leptospira interrogans sensu lato* (s.l.), using serological and molecular methods.

Between April to June 2011 was made a clinical-epidemiological survey, after informed consent, in 141 patients (64 male and 77 females) admitted in Lobito General Hospital, whose principal signs were headache and fever with unknown origin. A total of 141 sera and 36 urine samples were collected.

The serological evaluation was performed, firstly, at the local lab, by a screening test, the Macroscopic Agglutination test (MACROLepto), and by Microscopic Agglutination Test (MAT) – reference test, at the Leptospirosis Lab (IHMT, Lisbon). *Leptospira* DNA detection was performed by PCR targeting the *hap I* gene. We also performed sequencing of the PCR products.

The major clinical manifestations were as follows: headaches (73,8%), fever (65,2%), myalgia (41,1%) and nausea (33,3%). Within the epidemiological data was observed that 131 patients had contact with the main leptospire reservoir and 76 drunk non-potable water.

Serological results showed the following MACRO reactivities: 14 (10%) positives and 18 (13%) doubtful, showing seroprevalence with Icterohaemorrhagiae (Copenhageni), Australis (Bratislava) and Sejroe serogroups. Of these samples, five (16%) were confirmed by MAT (presence of agglutinin's anti-*L. interrogans* s.l.). In parallel, leptospiral DNA was amplified in 13<sup>+</sup>/81 (16%) of sera and only one sample of urine. The sequencing results showed the unequivocal identification of two

serovars (Copenhageni and Lai), both from Icterohaemorrhagiae serogroup of *L. interrogans* genospecies.

The results showed that the study population, most of them had contact with rodents and contact with non-potables waters, even those who engaged activities of lower epidemiological risk. This study also showed the presence of *Leptospira interrogans* infection in female active adults, being reasonable to assume a similar situation in other regions of the country.

Finally, it was demonstrated the existence of leptospirosis in the region, which may contribute to the inclusion of the disease in the list of febrile diseases in Angola and in other tropical countries.

# ÍNDICE

---

<b>Resumo</b>	iv
<b>Abstract</b>	vi
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	xi
<b>Índice de Figuras</b>	xii
<b>Índice de Tabelas</b>	xiv

## Parte A

### Leptospiras – Estado da Arte

<b>1. <i>Leptospira</i> spp.</b>	2
1.1. Taxonomia e Biologia do agente: <i>Leptospira</i> spp.	2
1.2. Classificação Convencional (Fenotípica) e Molecular	3
1.3. Crescimento <i>in vitro</i> (cultura)	4
<b>2. Epidemiologia</b>	5
2.1. Ciclo de Transmissão das Leptospiras	5
2.2. Leptospirose Humana	6
2.3. Distribuição Mundial – importância actual da Leptospirose	7
<b>3. Patogénese</b>	9
<b>4. Diagnóstico Laboratorial</b>	9
4.1. Métodos Directos	10
4.1.1. Microscopia	10
4.1.2. Cultura	11
4.1.3. Amplificação do DNA	11
4.2. Métodos Indirectos	12
4.2.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (MACROLepto) - Técnica de Rastreio	12
4.2.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) – Técnica de referência	13

**Parte B – Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular**

<b>1. Objectivo do Estudo</b>	16
<b>2. Justificação do Estudo</b>	16
<b>3. População Alvo e selecção da amostra</b>	17
3.1. Critérios de inclusão do Estudo	17
3.2. Consentimento informado	18
<b>4. Material e Métodos</b>	18
4.1. Inquérito Clínico-Epidemiológico	18
4.2. Teste MACROLepto: Preparação do Antigénio	19
4.3. Testes Serológicos	20
4.3.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (MACROLepto)	21
4.3.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) – Técnica de referência	21
4.4. Testes Moleculares	23
4.4.1. Extração de DNA amostras séricas e de urina	23
4.4.2. Testes de Especificidade e de Sensibilidade do <i>primer</i> hap 1	23
4.4.3. Amplificação do DNA por PCR	24
4.4.3.1. <i>Nested</i> de PCR com os <i>primers</i> universais (A e B)	24
4.4.3.2. PCR com os <i>primers</i> hap 1	26
4.4.4. Sequenciação dos produtos de PCR	27
4.5. Tratamento e Análise de Dados	27
4.5.1. Base de Dados	27
4.5.2. Critérios de Reactividade do Teste MACROLepto	27

4.5.3. Avaliação do “Valor Preditivo” do Teste MACROLepto	27
<b>5. Resultados</b>	<b>29</b>
5.1. Caracterização da Amostra	29
5.1.1. Aspectos epidemiológicos quanto ao tipo de exposição à infecção por <i>Leptospira</i> spp.	31
5.1.1.1. Ocupação Profissional	31
5.1.1.2. Contacto com Reservatórios ou Potenciais Hospedeiros	33
5.1.1.3. Contacto com águas possivelmente contaminadas com leptospiros	34
5.2. Sinais e Sintomas clínicos dos Pacientes	35
5.3. Testes Serológicos	36
5.3.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (MACROLepto)	36
5.3.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) – Técnica de referência	37
5.4. Teste Moleculares	39
5.4.1. Testes de Especificidade e de Sensibilidade do <i>primer</i> hap 1	39
5.4.2. Amplificação de DNA com os <i>primers</i> A e B	40
5.4.3. Amplificação de DNA com os <i>primers</i> hap 1	40
5.4.4. Sequenciação dos produtos de PCR	42
<b>6. Discussão</b>	<b>43</b>
<b>7. Conclusões e Considerações Finais</b>	<b>51</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>53</b>
<b>Anexos</b>	<b>58</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

% - Percentagem	OMS – Organização Mundial de Saúde
µl - Microlitro	p – Nível de significância
µM – Micro Molar	pb – Pares de Base
A – Adenina	PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
C – Citosina	s.l. – sensu lato
DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)	s.s. – sensu stricto
dNTP – Desoxirribonucleótido-trifosfato	T – Timina
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético	TAE – Tampão Tris, Ácido Acético e EDTA
EMJH – Ellinghausen, McCullough & Johnson Harris	TAM – Técnica de Aglutinação Microscópica
G – Guanina	tris-HCl – Tris (hidroximetil) aminometano – ácido clorídrico
HGL – Hospital Geral do Lobito	U – Unidades
IgG - Imunoglobulina do tipo G	UEI– Unidade de Ensino e Investigação
IgM – Imunoglobulina do tipo M	WHO/ILS – World Health Organization / International Leptospirosis Society
IHMT/UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa	S – Sensibilidade
MACROLepto – Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina	E - Especificidade
MgCl <sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio	VPN – Valor Preditivo Negativo
min – Minuto	VPN - Valor Preditivo Positivo
ml – Mililitro	
mM - Milimoles ou Milimolar	
°C – Grau Celsius	

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura A.1</b>	Microfotografia electrónica de <i>Leptospira</i> (adaptado de: <a href="http://jociencia.blogspot.com/">http://jociencia.blogspot.com/</a> )	2
<b>Figura A.2</b>	Representação esquemática da estrutura de <i>Leptospira</i> spp. A- Bactéria inteira mostrando o flagelo periplasmático; B – Corte transversal (adaptado de Vieira, 2006)	3
<b>Figura A.3</b>	Ciclo de transmissão das leptospirosas (adaptado de Victoriano et al. 2009)	5
<b>Figura A.4</b>	Vendedor de água (adaptado de: <a href="http://semprejuntos-irevoltar.blogspot.com/">http://semprejuntos-irevoltar.blogspot.com/</a> )	8
<b>Figura A.5</b>	Ilustração esquemática de um microscópio de campo escuro (adaptado de Wheeler, 2006)	11
<b>Figura A.6</b>	Leptospirosas observadas por microscopia de campo escuro (adaptado de: <a href="http://aapredbook.aappublications.org/">http://aapredbook.aappublications.org/</a> )	11
<b>Figura A.7</b>	Representação esquemática da técnica MACROLepto – Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (adaptado de Gonçalves, 2010)	12
<b>Figura B.1.</b>	Mapa da Província de Benguela com a região do Lobito destacada (adaptado de: <a href="http://www.governo.gov.ao/NoticiaD.aspx?Codigo=11111">http://www.governo.gov.ao/NoticiaD.aspx?Codigo=11111</a> )	17
<b>Figura B.2</b>	Fluxograma das técnicas utilizadas de acordo com a sequência das etapas laboratoriais	20
<b>Figura B.3</b>	Distribuição da amostra (n=141 doentes) por Género (feminino e masculino)	29
<b>Figura B.4</b>	Distribuição dos doentes (n=140) de acordo com faixa etária versus género	30
<b>Figura B.5</b>	Distribuição da amostra em estudo por grupos profissionais susceptíveis ao risco de infecção por <i>Leptospira</i> spp.	32
<b>Figura B.6</b>	Motoqueiros nas estradas do Lobito que se encontravam inundadas depois das chuvas (fotografia original do autor)	32
<b>Figura B.7</b>	Ovinos nas ruas do bairro da Lixeira (Lobito) (fotografia original do autor)	33
<b>Figura B.8</b>	Representação gráfica dos dados obtidos relativos ao contacto com os diversos tipos de água e por género	34
<b>Figura B.9</b>	Habitacões tradicionais Angolanas Pós-Guerra e ribeira atravessar o caminho (fotografia original do autor)	35
<b>Figura B.10</b>	Ribeira com detritos. Local de recreio de crianças (fotografia original do autor)	35
<b>Figura B.11</b>	Principais manifestações clínicas observadas nos pacientes	36

<b>Figura B.12</b>	Representação gráfica dos serogrupos/serovares de <i>Leptospira interrogans</i> s.l. e <i>L. biflexa</i> s.l. (usada como “sentinela”) detectados nas amostras séricas positivas e não conclusivas pela técnica MACROLepto [Ictero – Icterohaemorrhagiae; Aut. – Autumnalis]	37
<b>Figura B.13</b>	Resultado do teste de especificidade para os <i>primers</i> hap 1 (482 pb) de estirpes de <i>L. interrogans</i> s.l. Legenda: M – Marcador molecular (100-1000 pb); C <sup>+</sup> – Controlo positivo <i>L. interrogans</i> (Ballum); 1 - Icterohaemorrhagiae (RGA); 2 – Ballum (Arborea); 3 – Pomona; 4 – Patoc (de <i>L. biflexa</i> )	39
<b>Figura B.14</b>	Resultado do teste de sensibilidade da PCR com os <i>primers</i> hap 1 (482 pb) em diluições seriadas de uma cultura de <i>L. interrogans</i> s.l. (Ballum). Legenda: M – Marcador molecular (100-1000 pb); Ballum (10 <sup>8</sup> bactéria/ml - 1 bactéria/ml); C <sub>1</sub> <sup>-</sup> e C <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Controlo negativo <i>L. biflexa</i> (Patoc)	40
<b>Figura B.15</b>	Amplificação do DNA leptospírico com os <i>primers</i> hap 1 em soros previamente analisados por MACROLepto. Legenda: M-marcador molecular (100-1000 pb); A21, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36 – amostras de soro; N1 e N2 – Controlos Negativos da extração; C <sub>PCR</sub> <sup>-</sup> – Controlo Negativo do PCR; C <sub>lep</sub> <sup>+</sup> – Controlo Positivo 10 <sup>7</sup> bactérias/ml (serovar Copenhageni).	41
<b>Figura B.16</b>	Sequência obtida dos amplicões correspondentes aos serovares Copenhageni e Lai da espécie genética <i>L. interrogans</i> sensu stricto	42

## ÍNDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela A.1</b>	Reservatórios/Hospedeiros de serovares de <i>Leptospira interrogans</i> s.l. mais comuns no Mundo ( <i>adaptado de Bharti et al., 2003</i> )	7
<b>Tabela A.2</b>	Bateria de referência de serovares de <i>Leptospira</i> spp. para a TAM – Europa ( <i>adaptado de WHO/ILS, 2003</i> )	14
<b>Tabela B.1</b>	Antigénios da <i>Leptospira interrogans</i> s.l. e de <i>L. biflexa</i> s.l. utilizados no teste MACROLepto	19
<b>Tabela B.2</b>	Antigénios de <i>L. interrogans</i> s.l. e de <i>L. biflexa</i> s.l. utilizados no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT)	22
<b>Tabela B.3</b>	Condições do <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> A e B	25
<b>Tabela B.4</b>	Condições da PCR com os <i>primers</i> hap 1	26
<b>Tabela B.5</b>	Distribuição da amostra (140 doentes) por faixas etárias em relação ao Género (Fi – Frequência absoluta)	30
<b>Tabela B.6</b>	Distribuição dos grupos profissionais em relação ao risco de infecção por <i>Leptospira</i> spp.	31
<b>Tabela B.7</b>	Distribuição dos dados (n=140 pacientes) relativos ao contacto com reservatórios/hospedeiros acidentais (os valores estão em frequência absoluta)	33
<b>Tabela B.8</b>	Distribuição dos dados relativos ao contacto dos pacientes com diversos tipos de água por género	34
<b>Tabela B.9</b>	Resultados obtidos no método de diagnóstico serológico de rastreio (MACROLepto) e de referência (TAM) [Fi – Frequência absoluta]	38
<b>Tabela B.10</b>	Comparação dos resultados obtidos pelo teste MACROLepto <i>versus</i> TAM	38
<b>Tabela B.11</b>	Resultados da PCR (com os <i>primers</i> hap 1) em amostras inicialmente avaliadas pela técnica MACROLepto. As amostras negativas pela MACROLepto são de doentes com febre e que assumiram contacto prévio com roedores.	41



# Parte A

## LEPTOSPIRAS – ESTADO DA ARTE

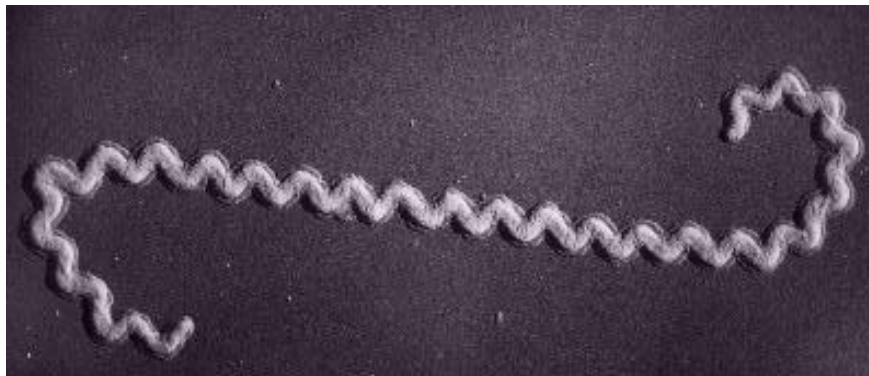
### 1. *LEPTOSPIRA* SPP.

#### 1.1. TAXONOMIA E BIOLOGIA DO AGENTE: *Leptospira* spp.

As leptospiros pertencem ao domínio *Bacteria* (Woese *et al.*, 1990; Haeckel, 1894), filo *Spirochaetes* (Garrity *et al.*, 2001), classe “*Spirochaetes*” (Garrity *et al.*, 2001), ordem *Spirochaetales* (Garrity *et al.*, 2001) que inclui duas famílias: Spirochaetaceae e Leptospiraceae. Estas duas famílias incluem os três géneros de espiroquetas com importância médica (*Borrelia*, *Treponema* e *Leptospira*).

Após a actualização de 2001, a família Leptospiraceae inclui dois géneros: *Leptospira* e *Leptonema*, sendo que na última edição de “BERGEY’S Manual of Systematic Bacteriology” (2005), o género *Leptospira* é constituído por duas espécies: *L. biflexa* e *L. interrogans*, sendo a primeira saprófita e a segunda patogénica.

Actualmente, o grupo das leptospiros patogénicas é constituído por 20 espécies genéticas diferentes (20 genoespécies).

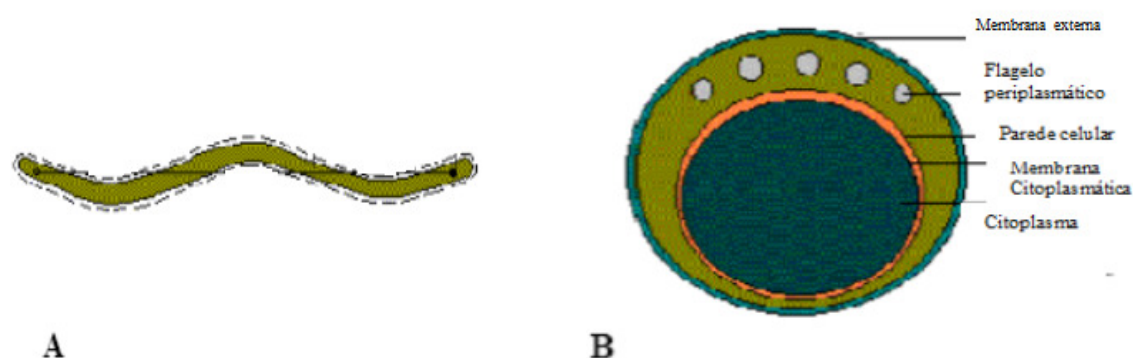


**Figura A.1** – Microfotografia electrónica de *Leptospira*  
(adaptado de: <http://jociencia.blogspot.com/>)

Estas bactérias (espiroquetas) são aeróbias obrigatórias, gram negativas com 1-20 µm de comprimento por 0,1 µm de diâmetro. São organismos muito finos e flexíveis com as extremidades encurvadas em forma de gancho (Faine *et al.*, 1999) (**Figura A.1**), e apenas visíveis em microscopia de fundo escuro. A motilidade é uma característica

particular das leptospiros, admitindo-se que tem origem no filamento axial que atravessa toda a bactéria (**Figura A.2**), conhecido como flagelo ou endoflagelo (Faine *et al.*, 1999). Este flagelo encontra-se ligado à membrana celular que se contrai periodicamente (Bharti *et al.*, 2003).

Em microscopia electrónica, observa-se que as leptospiros têm uma membrana dupla, característica que partilham com outras espiroquetas (Levett, 2001). Têm ainda um envelope exterior que envolve a membrana citoplasmática e a parede celular, sendo esta última a estrutura responsável pela forma helicoidal da bactéria (Faine *et al.*, 1999).



**Figura A.2** – Representação esquemática da estrutura de *Leptospira* spp. A- Bactéria inteira mostrando o flagelo periplasmático; B – Corte transversal (*adaptado de* Vieira, 2006)

## 1.2. CLASSIFICAÇÃO CONVENCIONAL (FENOTÍPICA) E MOLECULAR

A classificação e nomenclatura das leptospiros é uma questão complexa, dada a co-existência de dois sistemas de classificação diferentes (Vijayachari *et al.*, 2008).

Na classificação convencional (fenotípica), as leptospiros estão divididas em duas espécies: *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.), espécie patogénica e a espécie *L. biflexa* (s.l.), a qual inclui todas as leptospiros saprófitas isoladas do ambiente, sendo o serovar o *taxon* base (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

A classificação dos serovares é baseada na expressão de epítomos expostos à superfície dos antígenos no mosaico lipopolissacarídeo da bactéria (Collares-Pereira, 1992; Adler, 2009; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010). No entanto, a especificidade dos epítomos depende da composição e orientação dos açúcares (Adler, 2009).

Por sua vez, os serovares são agrupados em serogrupos, sendo que alguns dos primeiros estão directamente associados aos respectivos reservatórios (roedores e outros) (Bharti *et al.*, 2003). De acordo com esta classificação foi oficialmente reconhecido que no género *Leptospira* existem 24 serogrupos de *L. interrogans* s.l., com mais de 250 serovares, e cerca de 38 serogrupos de *L. biflexa* s.l., com 65 serovares (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Vieira, 2006).

Do ponto de vista molecular, o genoma das leptospiras é constituído por dois cromossomas circulares (Bharti *et al.*, 2003); um cromossoma com a dimensão de 4.332.241pb – 4.277.185pb e um outro de pequena dimensão com cerca de 358.943pb – 350.181pb (Saier *et al.*, 2001).

O cromossoma de maior dimensão das leptospiras quando comparado com os de outras espiroquetas é, só por si, um indicador da capacidade de adaptação destas espiroquetas a diferentes reservatórios/hospedeiros e diferentes ambientes (Bharti *et al.*, 2003).

Assim, na prática, quando se trabalha com novos isolados de *Leptospira*, os mesmos devem ser caracterizados por técnicas serológicas e moleculares (Bharti *et al.*, 2003), numa perspectiva polifásica das duas classificações.

### 1.3. CRESCIMENTO *IN VITRO* (CULTURA)

As leptospiras são bactérias aeróbias obrigatórias com um tempo de geração da ordem das 7-12h. Estas bactérias crescem em meio de cultura constituído principalmente por ácidos gordos de cadeia longa e soro de coelho ou albumina de soro bovino (Bharti *et al.*, 2003). É utilizado comumente o meio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). A cultura deve ser mantida com uma temperatura de 28°-30°C e sempre que possível sob agitação permanente (Faine, 1982; Collares Pereira, 1992; Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003).

O crescimento das leptospiras é lento e fastidioso sobretudo na cultura inicial, podendo levar semanas. As subculturas, porém, quando adaptadas ao meio líquido crescem, geralmente, entre 10-14 dias (Levett, 2001).

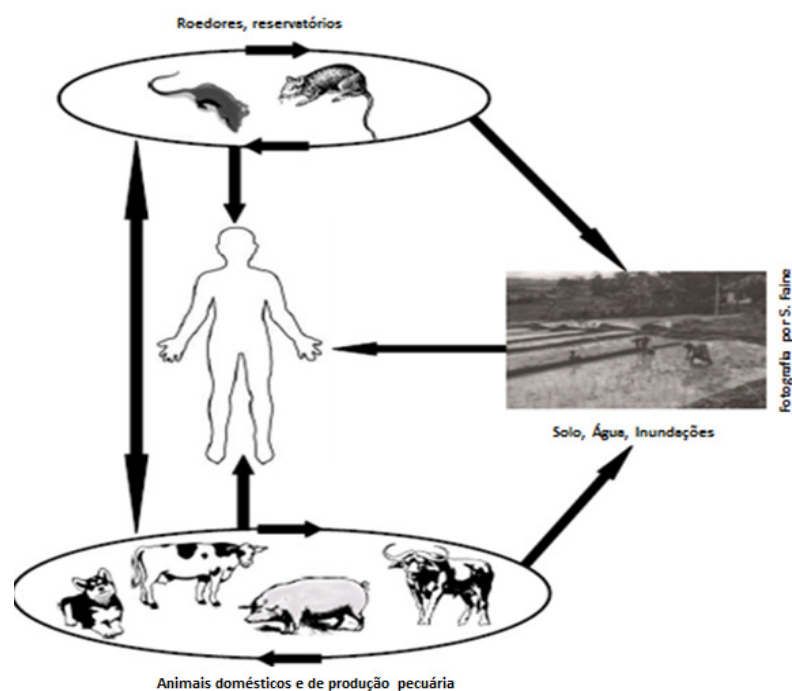
É importante ainda referir que as leptospiros tornam-se diferentes na aparência e motilidade conforme a composição do meio em que se encontram. No caso de deficiência nutricional estas bactérias podem tornar-se extremamente longas e não ocorrer a fissão binária (Faine *et al.*, 1999; Bharti *et al.*, 2003).

## 2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.1. CICLO DE TRANSMISSÃO DAS LEPTOSPIRAS

A Leptospirose é uma infecção bacteriana zoonótica que se dissemina entre diferentes espécies ou grupos de animais de forma cíclica (Faine, 1982). O ciclo é complexo e dinâmico, devido à capacidade da bactéria poder infectar diferentes hospedeiros animais. (Hartskeerl *et al.*, 2011).

As leptospiros patogénicas têm alojam-se preferencialmente nos rins dos reservatórios (ex: roedores) nos túbulos proximais por longos períodos de tempo (Adler e Moctezuma, 2009). Uma vez que os roedores são portadores crónicos da infecção, continuam a excretar leptospiros infectantes através da urina, contaminando solos, águas e toda a área envolvente ao seu habitat (Faine, 1982) (**Figura A.3**).



**Figura A.3** – Ciclo de transmissão das leptospiros (*adaptado de Victoriano et al.*, 2009)

Assim, o risco de infecção é maior para outros animais quando as águas superficiais ficam contaminadas por estas bactérias (Faine, 1982). Por outro lado, as leptospiras podem sobreviver durante longos períodos de tempo em ambientes húmidos, resistindo no exterior por vários meses (Hartskeerl *et al.*, 2011), característica que aumenta a probabilidade de infectarem novos hospedeiros.

A via de transmissão das leptospiras depende de diversos factores entre os quais: o clima, a densidade populacional dos reservatórios e o grau de contacto entre estes (portadores crónicos) e os hospedeiros acidentais, nos quais se inclui o Homem (Levett, 2001).

## 2.2. LEPTOSPIROSE HUMANA

A Leptospirose humana é uma zoonose, dado o envolvimento de fontes animais na transmissão das leptospiras aos humanos. (Adler e Moctezuma, 2009).

A prevalência de diferentes serovares infectantes na população humana depende dos reservatórios animais existentes e das leptospiras presentes nos mesmos, das condições ambientais, das ocupações profissionais e dos comportamentos, atitudes e práticas das populações, em particular nas actividades agrícolas e pecuárias (Bharti *et al.*, 2003). É conhecido que a doença está particularmente associada a determinadas profissões e/ou ocupações, tais como agricultores, mineiros, trabalhadores de saneamento, de pecuária, de matadouros, veterinários, etc. (Hartskeerl *et al.*, 2011). Recentemente, novos casos de Leptospirose humana têm ocorrido em indivíduos que realizam actividades de lazer (ex: safaris, *rafting*, canoagem e outras) e em expedições militares, quer em treino quer em situações de combate nas mesmas condições (Pappas *et al.*, 2007).

A infecção humana por leptospiras ocorre geralmente por contacto directo ou indirecto com a urina de animais infectados ou águas, solos e alimentos contaminados (Levett, 2001; Pavli e Maltezou, 2008).

Como referido anteriormente existem serogrupos que incluem serovares que têm sido associados a diferentes reservatórios e/ou hospedeiros animais (**Tabela A.1**).

Assim, os quatro serogrupos mais comumente identificados por serologia em casos humanos são Pomona, provenientes dos bovinos e suínos; Canicola dos cães, Icterohaemorrhagiae e Ballum dos roedores, em particular, das ratazanas e ratos.

**Tabela A.1** – Reservatórios/Hospedeiros dos serovares de *Leptospira interrogans* s.l. mais comuns em todo o Mundo (*adaptado de Bharti et al., 2003*)

Reservatórios/Hospedeiros	Serovar (es)
Ratazanas	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Ratos	Ballum Arborea
Bovinos e Ovinos	Hardjo, Pomona
Cavalos	Bratislava
Canídeos	Canicola
Suínos	Pomona, Taravossi
Guaxinis	Grippotyphosa
Marsupiais	Grippotyphosa
Morcegos	Cynopteri, Wolffii

### 2.3. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL – IMPORTÂNCIA ACTUAL DA LEPTOSPIROSE

A Leptospirose é hoje considerada uma doença emergente e/ou re-emergente de importância mundial. A transmissão dos agentes etiológicos ocorre por todo o mundo, em áreas rurais e urbanas, sendo que a sua incidência tem maior significado em regiões tropicais comparativamente às regiões temperadas (Pavli e Maltezou, 2008). Porém, a infecção tanto ocorre em países industrializados como em países em desenvolvimento (Hartskeerl *et al.*, 2011).

A elevada incidência nos trópicos é assim justificada pelo longo tempo de sobrevivência das leptospiras, para o que contribui a temperatura e a humidade

favoráveis. A existência de águas superficiais, decorrentes da época das chuvas e as deficientes condições de saneamento (Pavli e Maltezou, 2008) são exemplos que explicam a relação entre os determinantes socioeconômicos (**Figura A.4**) e as condições climáticas que favorecem a sobrevivência das bactérias infectantes, com o consequente risco de exposição para as populações (Pappas *et al.*, 2007).

Nas regiões temperadas, os picos de infecção ocorrem, geralmente, durante as estações quentes, enquanto nos trópicos ocorrem durante todo o ano com um aumento na época das chuvas (Farr, 1995; Pavli e Maltezou, 2008).

Nos últimos anos têm sido reportados grandes surtos de Leptospirose após períodos de elevada pluviosidade e inundações, motivo pelo qual por vezes se designa por “Doença das Chuvas” (Pavli e Maltezou, 2008).



**Figura A.4** – Vendedor de água  
(adaptado de: <http://semprejuntos-irevoltar.blogspot.com/>)

No Continente Africano desconhece-se a incidência da doença em alguns dos países. No entanto, existem registos de pequenos surtos que provam a sua existência. Esta patologia é, assim, sub-diagnosticada e por consequência estará sub-avaliada (Pappas *et al.*, 2007).

### 3. PATOGÉNESE

As leptospirosas infectam o Homem penetrando a pele através de cortes ou escoriações e através das membranas mucosas ou por via conjuntival. Devido à sua elevada motilidade, também conseguem penetrar a pele quando esta é exposta por longos períodos em águas contaminadas (Faine, 1982). A ingestão de águas e alimentos contaminados ou a inalação de aerossóis de urina podem, também, causar infecção (Pavli e Maltezou, 2008).

As leptospirosas patogénicas invadem rapidamente o organismo por via sanguínea, atingindo diversos órgãos, em particular os rins, que constituem a localização preferencial.

As manifestações clínicas da Leptospirose são muito variáveis, e muitas vezes os casos são inaparentes ou sub-clínicos. No entanto, a Leptospirose é uma doença sistémica caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, e manifestações pulmonares, entre outras. Geralmente, as primeiras manifestações caracterizam-se por cefaleias, febre, mal-estar, mialgias, sufusão conjuntival e, por vezes, *rash* cutâneo.

Os sintomas clínicos da Leptospirose humana são semelhantes aos de outras infecções provocadas por parasitas, vírus e bactérias, tais como a Malária, Hepatite viral, Dengue e Febre Tifoide, entre outras.

### 4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico definitivo da Leptospirose humana ou animal é obrigatoriamente laboratorial, devido à diversidade de sintomas que a doença apresenta o que provoca, na generalidade dos casos, um quadro clínico inespecífico. Assim, os estudos epidemiológicos são imprescindíveis na saúde pública, recorrendo ao diagnóstico laboratorial para determinar os serogrupos das estirpes infectantes, a par do conhecimento da fonte de transmissão, dos potenciais reservatórios e da sua localização (WHO/ILS, 2003).

O diagnóstico laboratorial para a Leptospirose baseia-se, principalmente em métodos directos (ex: microscopia, cultura e, mais recentemente, em técnicas de

biologia molecular para detecção de DNA leptospírico e em métodos indirectos para a detecção de anticorpos específicos (MACROLepto, TAM, ELISA, ...).

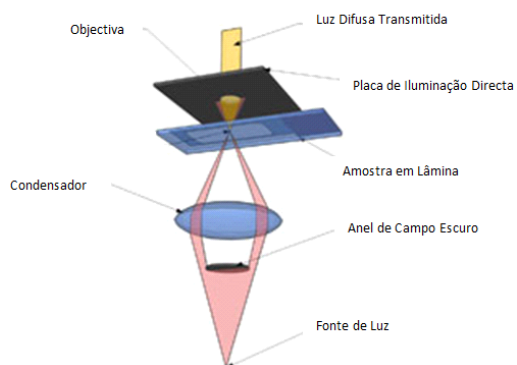
#### 4.1. MÉTODOS DIRECTOS

##### 4.1.1. MICROSCOPIA

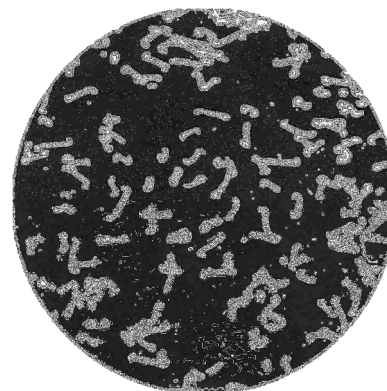
Existem várias técnicas de microscopia utilizadas para observar as leptospiras, tais como: a microscopia de campo escuro (**Figura A.5**), a microscopia de fluorescência e ainda a microscopia de campo claro quando se trata de preparações histológicas, ou culturas coradas por impregnação argêntica.

A microscopia de campo escuro é obrigatória e muito fiável, uma vez que as leptospiras têm uma motilidade e morfologia muito características. Todavia, esta técnica tem algumas limitações devendo, nomeadamente, ser realizada por pessoal especializado e o material deve estar livre de artefactos, porque estes podem dificultar a observação e, conseqüentemente interferir com a interpretação inequívoca do material biológico (WHO/ILS, 2003; Vieira, 2006).

A microscopia de campo escuro permite a observação directa de leptospiras (**Figura A.6**) no sangue, em particular, entre o período do início dos sintomas e o aparecimento dos anticorpos. Nos primeiros dias pode-se observar leptospiras na urina quase sempre após o aparecimento dos primeiros anticorpos no organismo (Collares-Pereira, 1992).



**Figura A.5** – Representação esquemática de um microscópio óptico de campo escuro (*adaptado de Wheeler, 2006*)



**Figura A.6** - Leptospiras observadas em microscopia de campo escuro (*adaptado de Carreira, 2009*)

#### 4.1.2. CULTURA

A cultura é o método de excelência para isolar as leptospiros, no entanto, não é realizado no diagnóstico de rotina, devido ao já referido crescimento fastidioso das leptospiros, o que implica uma resposta muito tardia por parte do laboratório. No entanto, este método permite detectar as leptospiros na fase precoce da infecção, a partir de fluídos orgânicos como a urina (urocultura) e o sangue (hemocultura) (Vieira, 2006). Contudo, é justo referir aqui a importância desta metodologia para estudos epidemiológicos ao nível dos reservatórios (roedores), e ainda em estudos “*post-mortem*” em humanos.

#### 4.1.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), no âmbito do diagnóstico laboratorial da Leptospirose, tem vindo a ser cada vez mais usada para amplificar o DNA leptospírico no soro, urina e líquido, e em tecidos “*post-mortem*” de diferentes órgãos, contribuindo também para auxiliar o diagnóstico laboratorial (Brown *et al.*, 1995).

Esta técnica tem a vantagem de detectar as leptospiros ou o seu DNA numa fase precoce da doença e, sobretudo, em casos de silêncio imunitário (Vieira, 2006).

#### 4.2. MÉTODOS INDIRECTOS

##### 4.2.1. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MACROSCÓPICA SOBRE LÂMINA (MACROLEPTO) – TÉCNICA DE RASTREIO

O Teste de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (MACROLepto), também designado por Teste de Macroaglutinação em Lâmina é uma técnica utilizada para rastreio laboratorial da Leptospirose. Baseia-se numa reacção de aglutinação visível a olho nu sobre uma lâmina de vidro, utilizando o soro “problema” homogeneizado com o antígeno inactivo (**Figura A.7**).



**Figura A.7** – Representação esquemática da técnica MACROLepto – Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre Lâmina (*adaptado de Gonçalves, 2010*)

Esta técnica é muito vantajosa em áreas onde não existe suporte laboratorial especializado, uma vez que não exige antígenos vivos e é de execução rápida e fácil.

O teste MACROLepto é ainda, um teste com uma sensibilidade da ordem de 95% e uma especificidade de 93%. Acresce, que o teste é tanto mais sensível quanto menor for o tempo de evolução clínica após o início dos primeiros sintomas da doença, sem perda da especificidade (Gonçalves, 2010).

#### 4.2.2. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (TAM) – TÉCNICA DE REFERÊNCIA

A Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) é a técnica de referência preconizada pela OMS, uma vez que é a única técnica que permite identificar o serogrupo provável da estirpe infectante (Collares-Pereira, 1992).

A TAM requer a existência de uma bateria de serovares vivos de *Leptospira interrogans* s.l., representativos dos principais serogrupos, incluindo também um serovar de *L. biflexa* s.l.. É, ainda, fundamental incluir na referida bateria serovares resultantes de isolados locais para aumentar a sensibilidade do teste face aos soros a analisar de determinada região/País.

O método de aglutinação microscópica consiste numa reacção de antigénio-anticorpo, que se observa apenas por microscopia de campo escuro. Este método é realizado em microplacas de fundo plano, utilizando soros diluídos em diluições de 1:50, numa fase de rastreio e, posteriormente sujeitos a diluições seriadas com antigénios vivos de referência. O soro problema é considerado positivo quando 50% ou mais das leptospiros estão aglutinadas, ou seja, quando existe aglutinação numa diluição igual ou superior a 1:100.

A técnica TAM não permite distinguir os anticorpos IgM (fase inicial da doença) dos do tipo IgG (fase mais tardia). Deste modo, é conveniente avaliar duas amostras serológicas obtidas com intervalo no mínimo de 10 dias, sendo o primeiro soro colhido, preferencialmente, na fase inicial. A segunda amostra permitirá, então, acompanhar a cinética dos anticorpos específicos e, se possível, determinar o serogrupo da estirpe infectante.

A **Tabela A.2** apresenta a lista de serovares recomendados pela OMS para a bateria de antigénios de referência a utilizar para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em soros humanos.

**Tabela A.2** – Bateria de referência de serovares de *Leptospira* spp. utilizados na TAM – Europa  
(adaptado de WHO/ILS, 2003)

Serogrupo	Serovar	Estirpes
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellonis	Castellon 3
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Copenhageni	Mus 20
Javanica	Javanica	Veldrat batavia 46
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
	Sejroe	Mus 84
	Wolffi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
Semarang	Patoc	Patoc 1

# Parte B

## **Parte B - Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular**

### **1. OBJECTIVOS DO ESTUDO**

- a) Determinar a prevalência, na população estudada, da exposição a alguns factores de risco de infecção: contacto com reservatórios e exposição a águas potencialmente contaminadas com leptospiras.
- b) Determinar a presença de anticorpos anti- *L. interrogans* s.l. em amostras séricas de doentes (admitidos na Urgência ou internados no Hospital Regional do Lobito) que apresentam cefaleias e febre como sinais clínicos principais.
- c) Determinar a seroprevalência da Leptospirose na população alvo, bem como determinar o(s) serogrupo(s) predominante(s), numa perspectiva polifásica (análise fenotípica e genotípica) com base nos resultados serológicos e moleculares obtidos.

### **2. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO**

A Leptospirose é conhecida como umas das doenças infecciosas emergentes, dando lugar a surtos em muitos Países nos diversos continentes (Levett, 2001). Trata-se de uma doença sistémica, caracterizada inicialmente por febre, cefaleias, insuficiência renal, hepática e/ou pulmonar (Adler *et al.*, 2009). A doença é causada por leptospiras patogénicas que se disseminam no ambiente (solo e colecções de água), principalmente pela urina de roedores, os principais reservatórios (Faine, 1999; Levett, 2001).

As zonas urbanas ou rurais com saneamento inadequado (ex: bairros degradados) são comunidades com elevado risco de exposição às leptospiras, além dos chamados grupos de risco mais susceptíveis, devido à sua ocupação profissional, tais como, os agricultores, os trabalhadores de saneamento, construção civil e outros (Abela-Ridder *et al.*, 2010). Admite-se que o continente africano constitua um bom exemplo desta

conjugação de factores, já que alguns Países apresentam clima e condições socioeconómicas favoráveis para uma incidência elevada da doença (Mgode *et al.*, 2006), contudo, pouco estudos epidemiológicos neste âmbito têm sido realizados.

Assim, a presente investigação foi direccionada para a pesquisa de anticorpos anti- *L. interrogans* s.l. e DNA específico em amostras biológicas (soro e urina) de doentes que apresentam cefaleias e febre e que recorrem aos cuidados de saúde do Hospital Gerall do Lobito (Angola), contribuindo-se para o conhecimento da incidência da Leptospirose nesta região.

### 3. POPULAÇÃO ALVO E SELECÇÃO DA AMOSTRA

#### 3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DO ESTUDO

O principal critério de selecção de doentes para este estudo foram doentes que apresentavam cefaleias e febre como principais sinais clínicos, de causa desconhecida.

De Abril a Junho de 2011 obtiveram-se 141 amostras séricas e 36 amostras de urina de 141 doentes (77 mulheres e 64 homens) atendidos no Serviço de Urgência e internados no Serviço de Medicina Interna do Hospital Geral do Lobito – Província de Benguela (**Figura B.1**).



**Figura B.1.** – Mapa da Província de Benguela com a região de Lobito destacada  
(adaptado de: <http://www.governo.gov.ao/NoticiaD.aspx?Codigo=11111>)

### 3.2. CONSENTIMENTO INFORMADO

Os doentes e os seus familiares foram informados sobre este estudo e os seus objectivos. As amostras utilizadas para a investigação, apenas foram colhidas e analisadas com a autorização prévia do doente e/ou do seu familiar (**ANEXO 1**).

Foi ainda preparado um folheto informativo sobre a doença, para facilitar a comunicação entre o doente/familiar e o médico. O folheto foi elaborado numa linguagem simples e com figuras, de forma a facilitar a compreensão dos factores de risco de infecção no âmbito da Leptospirose (**ANEXO 2**).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. INQUÉRITO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

Na presente investigação realizou-se um inquérito clínico-epidemiológico a todos os doentes voluntários a quem foram colhidas amostras séricas e de urina, de forma a conhecerem-se os aspectos epidemiológicos da população alvo, nomeadamente: a caracterização sociodemográfica e os conhecimentos, atitudes e práticas, face a potenciais fontes de risco.

A ficha de inquérito incluiu a identificação da amostra, número do doente, idade, género, ocupação profissional, tempo de evolução (desde o início dos sintomas), sinais e sintomas clínicos, informação epidemiológica sobre o tipo de exposição e ainda alguns dados hematológicos como o valor da hemoglobina (**ANEXO 3**).

#### 4.2. TESTE MACROLEPTO: PREPARAÇÃO DE ANTIGÉNIO

Para a técnica MACROLepto foi necessário preparar os antigénios (culturas vivas de *Leptospira* spp.) no laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL (Lisboa).

Os antigénios seleccionados foram escolhidos da bateria de referência da OMS, existente no referido laboratório da UEI de Microbiologia Médica do IHMT, tendo em atenção o critério de universalidade dos antigénios foram seleccionados alguns, os quais estão descritos na **Tabela B.1**:

**Tabela B.1** – Antigénios de *Leptospira interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l., utilizados no teste MACROLepto

Serogrupo	Serovar
Australis	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
Ballum	Arboreae
Canicola	Canicola
Grippothyphosa	Valbuzzi
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
Mini	Mini
Pomona	Mozdok
Sejroe	Hardjobovis
Sejroe	Sejroe
Sejroe	Wolffi
<b>Semarang*</b>	<b>Patoc*</b>

\*representante de *L. biflexa* (saprófita)

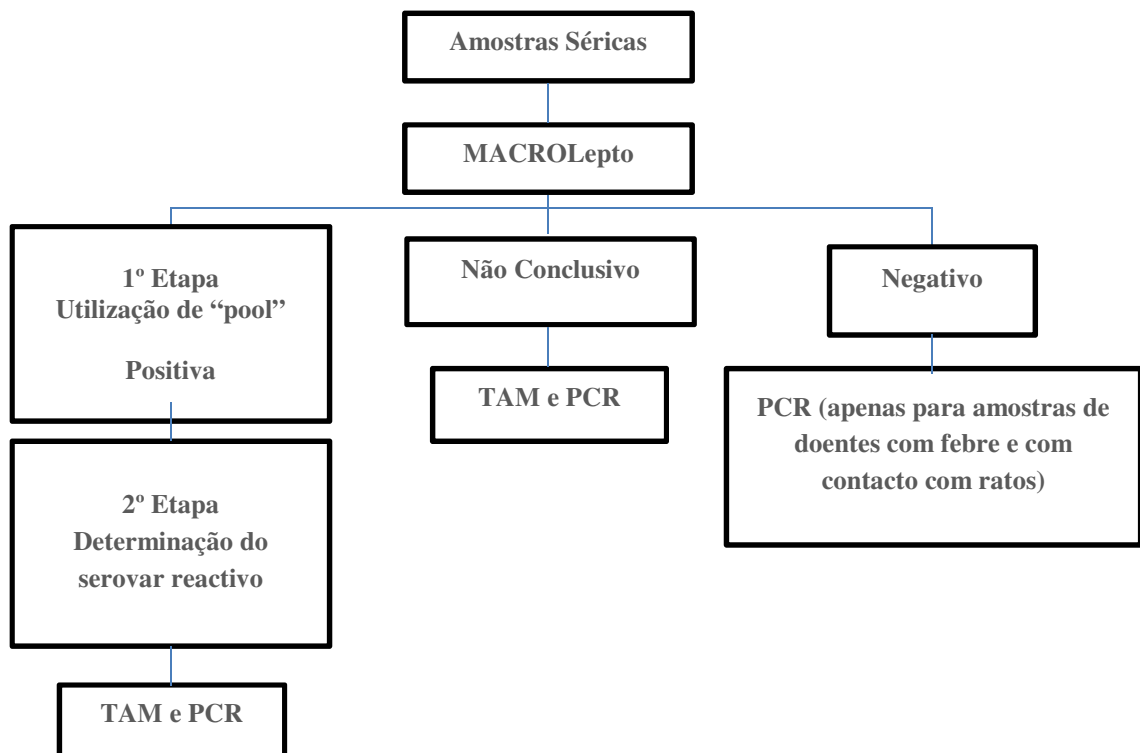
Cada antigénio (serovar) foi cultivado em EMJH em frascos de cultura e colocados na incubadora durante 5 a 7 dias sob as condições de temperatura e de agitação anteriormente referidas (*cf. Parte A – 1.3*). Após a obtenção das culturas na densidade ideal ( $\pm 1,5-2 \times 10^8$  leptospiras/ml), procedeu-se à sua inactivação através da

adição de uma solução tamponada de formol a 40%. Cada serovar foi centrifugado até à obtenção de uma solução antigénica concentrada.

Estes antigénios foram posteriormente testados, utilizando soros humanos com positividade previamente conhecida e ainda com soros negativos a fim de se averiguar a respectiva reactividade (capacidade de aglutinação). Os lotes de antigénio seleccionados foram aliquotados e refrigerados a 4°C até à sua utilização (ANEXO 4).

#### 4.3. TESTES SEROLÓGICOS

O fluxograma representado na **Figura B.2** resume os vários procedimentos laboratoriais efectuados nas amostras séricas obtidas dos doentes.



**Figura B.2** – Fluxograma das técnicas utilizadas de acordo com a sequência das etapas laboratoriais

#### 4.3.1. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MACROSCÓPICA SOBRE LÂMINA (MACROLEPTO)

De 141 doentes envolvidos no estudo foram analisadas amostras séricas (em igual número) pelo MACROLepto no laboratório de análises clínicas do HGL.

As amostras de sangue dos doentes foram centrifugadas para separação do soro e armazenadas a 4°C até à sua utilização no referido Hospital e, posteriormente transportadas para o laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT (Lisboa).

No primeiro ensaio do teste MACROLepto foi utilizado o total de serovares (antigénios) preparados previamente (*cf. Parte B - 4.2*) alguns dos quais foram associados do seguinte modo:

- Icterohaemorrhagiae/ Copenhageni;
- Sejroe/ Hardjobovis/ Wolffi;
- Mini/ Autumnalis.

As amostras que apresentaram aglutinação com os antigénios em “pool” anteriormente descritos foram novamente analisadas com os serovares reactivos para eliminar falsos-positivos. (ANEXO 4)

#### 4.3.2. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (TAM)

Em Lisboa, no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT) foram analisadas por TAM 30 amostras séricas, inicialmente positivas e não conclusivas no teste MACROLepto. Para a TAM, os serovares seleccionados (**Tabela B.2**) foram mantidos a 28°C em meio líquido de EMJH sob agitação, sendo sub-cultivados de 8-10 dias.

**Tabela B.2** – Antígenos de *L. interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l. utilizados no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (IHMT)

Serogrupo	Serovar	Estirpe
Semarang*	Patoc*	Patoc I*
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Mus 20
Pomona	Mozdok	5621
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Ballum	Arboreae	Arborea
Ballum	Ballum	Mus 127
Sejroe	Sejroe	M84
Ballum	Castellonis	Castellón 3
Panama	Panama	CZ 214
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Jonhson
Sejroe	Wolffi	3705
Mini	Mini	Sari
Sejroe	Hardjobovis	LELY 607
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Javanica	Poi	Poi
Grippotyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Australis	Bratislava	Jez Bratislava
Australis	Australis	Ballico
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana	LSU 1945
Bataviae	Bataviae	Van Tienen
Pomona	Pomona	Pomona
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A

\* representante de *L. biflexa* (saprófita)

Os critérios de seropositividade assumidos estão definidos pela OMS para áreas onde se conhece a seroprevalência da Leptospirose, no entanto, à falta de conhecimento sobre a Leptospirose em Angola, adoptou-se exactamente o critério da OMS, sendo consideradas positivas todas as amostras cuja reacção mostrou títulos iguais ou superiores a 1:100 (Faine *et al.*, 1999). (ANEXO 5)

Os testes TAM foram repetidos de modo a assegurar-se a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

#### 4.4. TESTES MOLECULARES

##### 4.4.1. EXTRACÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS SÉRICAS E DE URINA

Foi extraído DNA das amostras “problema”, tendo estas sido divididas em três grupos:

- Amostras positivas no método MACROLepto;
- Amostras não conclusivas no método MACROLepto;
- Amostras negativas no método MACROLepto, mas com a indicação de corresponderem a doentes com febre e que tiveram contacto com ratos.

O DNA das referidas amostras de soro, bem como das amostras de urina foi extraído de acordo com as indicações do protocolo do respectivo *kit* comercial [Citogene<sup>®</sup> DNA Cell & Tissue kit] da Citomed, adoptado e em uso no laboratório.

##### 4.4.2. TESTES DE ESPECIFICIDADE E DE SENSIBILIDADE DO *PRIMER* HAP 1

Antes de se iniciar o estudo molecular das amostras “problema” procedeu-se à realização de testes de sensibilidade e de especificidade dos *primers* hap 1, dirigido a amplificar DNA de leptospiros patogénicas.

O teste de especificidade foi realizado com os serovares Patoc, Icterohaemorrhagiae RGA, Ballum e Pomona, de forma a comprovar-se a amplificação apenas de leptospiras patogénicas.

No teste de sensibilidade usou-se DNA extraído de culturas do serogrupo Ballum de *L. interrogans* s.l., com densidade conhecida ( $10^8$  bactérias/ml), em nove diluições seriadas de base 10, até 1 bactéria/ml.

Tais procedimentos não foram executados para os *primers* A e B, dado a respectiva sensibilidade e especificidade serem previamente conhecidas.

#### 4.4.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR

##### 4.4.3.1. *Nested* PCR com os *primers* universais (A e B)

Para a amplificação do DNA leptospírico extraído das amostras de soro e de urina, foram utilizados *primers* baseados no gene *rrs* (16S RNAr), descritas por Merien *et al.* (1992) e designadas por **A** e **B**:

**A** – 5' – GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG – 3'

**B** – 5' – TTC CCC CCA TTG TTG AGC AAG AAT – 3'

Estas sequências iniciadoras (*primers*) amplificam o DNA de todas as estirpes de leptospiras, independentemente do respectivo carácter patogénico ou saprófito, produzindo um fragmento de 331 pb.

Dado tratar-se de *primers* universais foi testada numa abordagem complementar para incrementar a sensibilidade do teste, materializada numa segunda reacção (*nested*). No *nested-PCR* são utilizados dois pares de *primers*, neste caso, utilizaram-se novamente os *primers* da primeira reacção, com o objectivo de se amplificar apenas a sequência desejada.

Para a primeira reacção de amplificação, utilizou-se uma solução com o volume final de 50 µl, constituída por 10 mM de tris-HCL, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP (Bioline®), 1 µM de cada primer e 0,2 µl (1U) da Taq polimerase (Bioline®). Foram adicionados 5 µl (≈40 µg/ml) de DNA da amostra ‘template’ e água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

Para a segunda reacção de amplificação, as soluções obedeceram às concentrações anteriormente descritas, com a pequena diferença da adição de 3 µl (≈40 µg/ml) de DNA da amostra ‘template’, no caso, DNA resultando da primeira amplificação.

As soluções foram colocadas no termociclador MyCycler (BioRad®) programado com as condições óptimas de amplificação apresentadas na **Tabela B.3**.

**Tabela B.3** – Condições do *nested*-PCR com os primers A e B

1ª Reacção	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	3 min.	1
Emparelhamento	63°C	1,5 min.	
Extensão	72°C	2,0 min.	
Desnaturação	94°C	1,0 min.	29
Emparelhamento	63°C	1,5 min.	
Extensão	72°C	2,0 min.	
Extensão final	72°C	10 min.	
2ª Reacção			
Desnaturação	94°C	3 min.	1
Desnaturação	94°C	1 min.	30
Emparelhamento	63°C	1 min.	
Extensão	72°C	1 min.	
Extensão final	72°C	10 min.	1

#### 4.4.3.2. PCR com os *primers* hap 1

Para amplificação de DNA leptospírico, foram ainda utilizados *primers* cujas sequências foram obtidas do gene *hemolysis-associated protein 1 (hap 1)*, do serovar Autumnalis de *L. interrogans* s.l., que produz um fragmento com 482 pb (Branger *et al.*, 2001). As sequências são as seguintes:

*primer forward*: 5'- ACCGTGATTTTCCTAACTAAGGA -3'

*primer reverse*: 5'- AAGCGAGTAAGTAGAATTGAAGGATCGATC -3'

As soluções utilizadas na reacção de amplificação para um volume final de 25 µl foram as seguintes: 10 mM de Tris-HCL, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP (Bioline<sup>®</sup>), 1 µM de cada *primer* e 1U da Taq polimerase (Bioline<sup>®</sup>). Foram adicionados 2 µl (≈40 µg/ml) de DNA da amostra 'template' e água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas no termociclador MyCycler (BioRad<sup>®</sup>) programado com as condições óptimas de amplificação de acordo com a **Tabela B.4**.

**Tabela B.4** – Condições da PCR com o *primer* hap 1

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	95°C	5 min.	45x
Desnaturação	94°C	15s	
Emparelhamento	56°C	35s	
Extensão	72°C	40s	
Extensão final	72°C	10 min.	

Os testes moleculares foram, também, repetidos para assegurar a reprodutibilidade dos respectivos resultados.

#### 4.4.4. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

As amostras que foram positivas na PCR foram enviadas para a empresa StabVida para sequenciação, de forma a certificarmos da fiabilidade dos resultados e obtermos informação de qual ou quais as espécie(s) genotípica(s) de *Leptospira* circulante(s).

#### 4.5. TRATAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

##### 4.5.1. BASE DE DADOS

Foi construída uma base de dados (*Microsoft Access* versão 2010) propositadamente para este estudo, o que permitiu realizar o tratamento informatizado dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais referentes aos pacientes participantes no estudo.

##### 4.5.2. CRITÉRIOS DE REACTIVIDADE DO TESTE MACROLEPTO

Critérios de Reactividade	Positivo
	Negativo
	Não Conclusivo*

\* Os resultados não conclusivos foram incluídos no grupo dos negativos não incrementando o número de “falsos-positivos”.

##### 4.5.3. AVALIAÇÃO DO “VALOR DIAGNÓSTICO” DO TESTE MACROLEPTO

Critérios sob avaliação do Teste MACROLepto:

- Sensibilidade (S)
- Especificidade (E)
- Valores preditivos (valor preditivo negativo - VPN e valor preditivo positivo - VPP)

Fórmulas de Cálculo utilizadas:

	<b>TAM (Teste de Referência)</b>										
		a – Verdadeiros Positivos									
		b – Falsos Positivos									
		c – Falsos Negativos									
		d – Verdadeiros Negativos									
<b>MACROLepto (teste de rastreio)</b>		<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;"></th> <th style="width: 35%;">Positivo</th> <th style="width: 35%;">Negativo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Positivo</th> <td>a</td> <td>b</td> </tr> <tr> <th>Negativo</th> <td>c</td> <td>d</td> </tr> </tbody> </table>		Positivo	Negativo	Positivo	a	b	Negativo	c	d
		Positivo	Negativo								
	Positivo	a	b								
Negativo	c	d									

$$S = a / (a+c)$$

$$E = d / (b+d)$$

$$VPP = a / (a+b)$$

$$VPN = d / (c+d)$$

Foi ainda utilizado o Teste K (Thursfield, 1985) para determinação da concordância entre os testes de diagnóstico, sendo que o valor igual ou superior a 0,81 traduz uma boa concordância nos testes em avaliação.

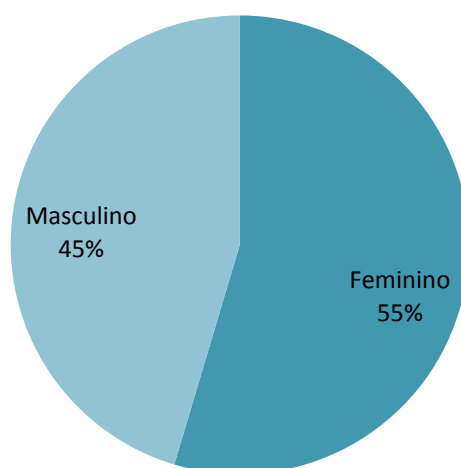
$$K = (a+b-P) / (1-P)$$

$$\text{em que } P = (a+b) \cdot (a+c) + (c+d) \cdot (b+d)$$

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Durante a realização dos trabalhos no Hospital Geral do Lobito (Província de Benguela) recolheram-se dados de 141 doentes, sendo 64 homens e 77 mulheres (**Figura B.3**).

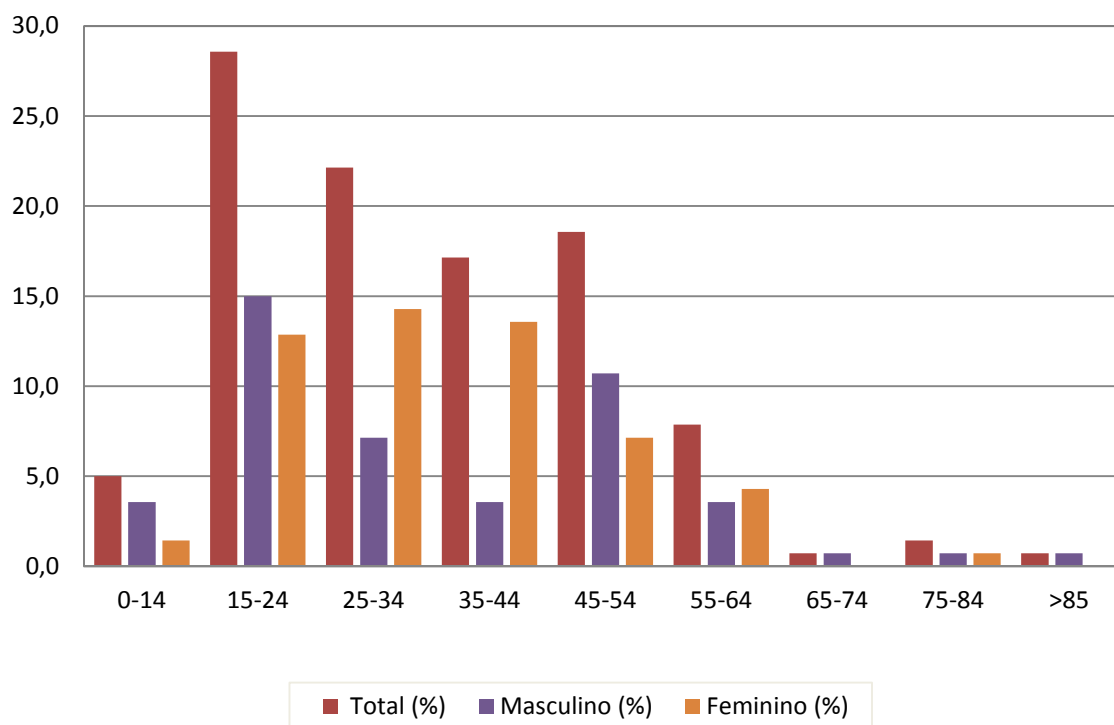


**Figura B.3** - Distribuição da amostra (n=141 doentes) por género (feminino e masculino)

Relativamente às faixas etárias pode observar-se a sua distribuição na **Tabela B.5** e no gráfico da **Figura B.4**. De referir que uma doente, embora contabilizada no total da amostra, não foi objecto de inquérito por se encontrar inconsciente. Por esta razão todos os dados de carácter epidemiológico referem-se apenas a 140 doentes.

**Tabela B.5** – Distribuição da amostra (n=140 doentes) por faixa etária em relação ao género (Fi – Frequência absoluta)

	Fi	Total (%)	Fi(Masculino)	Masculino (%)	Fi (Feminino)	Feminino (%)
<b>0-14</b>	7	5,0	5	3,6	2	1,4
<b>15-24</b>	40	28,6	21	15,0	18	12,9
<b>25-34</b>	31	22,1	10	7,1	20	14,3
<b>35-44</b>	24	17,1	5	3,6	19	13,6
<b>45-54</b>	26	18,6	15	10,7	10	7,1
<b>55-64</b>	11	7,9	5	3,6	6	4,3
<b>65-74</b>	1	0,7	1	0,7	0	0,0
<b>75-84</b>	2	1,4	1	0,7	1	0,7
<b>&gt;85</b>	1	0,7	1	0,7	0	0,0
<b>Total</b>	140		64	45,4	76	53,9



**Figura B.4** – Distribuição dos doentes (n=140) de acordo com faixa etária *versus* género

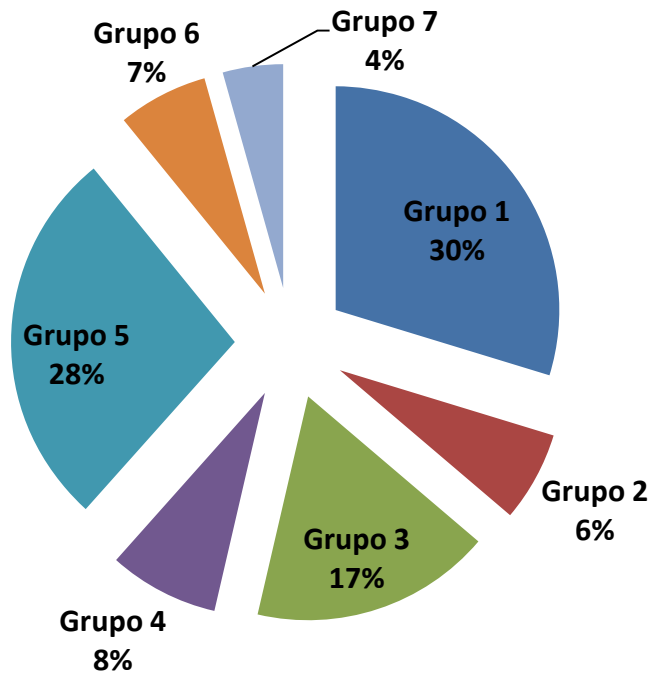
5.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS QUANTO AO TIPO DE EXPOSIÇÃO À INFECCÃO POR *LEPTOSPIRA* SPP.

5.1.1.1. OCUPAÇÃO PROFISSIONAL

No que respeita aos aspectos epidemiológicos, os dados obtidos quanto à ocupação profissional face às potenciais fontes de infecção de acordo com os inquéritos efectuados foram distribuídos em sete grupos. Na **Tabela B.6** observa-se a distribuição das ocupações profissionais por cada grupo de risco e no gráfico da **Figura B.5** observam-se as percentagens dos mesmos grupos referentes ao total da amostra populacional estudada.

**Tabela B.6** – Distribuição dos grupos profissionais em relação ao risco de infecção por *Leptospira* spp.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Administradores	Técnicos Auxiliares	Cozinheiros	Agentes da Autoridade
Contabilistas	Enfermeiros	Balconistas	Bombeiros
Estatísticos	Técnicos de Laboratório	Domésticas	Marinheiros
Estudantes		Empregadas	Militares
Gestores		Pasteleiros	Seguranças
Professores		Reformados	
		Talhantes	
		Desempregados	
Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	
Camionistas	Agricultores	<b>Crianças</b>	
Comerciantes	Construtores		
Feirantes	Pescadores		
Mecânicos	Canalizadores		
Motoqueiros			
Motoristas e Taxistas			
Operários			
Soldadores			
Trabalhadores de Bomba de combustível			



**Figura B.5** – Distribuição da amostra em estudo por grupos profissionais susceptíveis ao risco de infecção por *Leptospira* spp.



**Figura B.6** – Motoqueiros nas estradas do Lobito que se encontravam inundadas depois das chuvas (*fotografia original do autor*)

5.1.1.2. CONTACTO COM RESERVATÓRIOS OU POTENCIAIS HOSPEDEIROS

Na **Tabela B.7** observam-se os resultados obtidos de 140 inquiridos (n= 140 doentes inquiridos) sobre o risco de exposição a fontes animais. Na mesma tabela observa-se que foram os roedores (93,6%) e canídeos (55%) os animais com os quais o contacto dos inquiridos foi maior.

**Tabela B.7** – Distribuição dos dados relativos ao contacto dos doentes com reservatórios/hospedeiros acidentais (os valores estão em frequência absoluta)

	Roedores	Bovinos	Suínos	Canídeos	Outros
Roedores	78	1	5	26	21
Bovinos	1	1	0	0	0
Suínos	5	0	7	3	4
Canídeos	26	0	3	39	9
Outros	21	0	4	9	33
Total	131	2	19	77	67
Total (%)	93,6	1,4	13,6	55,0	47,9



**Figura B.7** – Caprinos nas ruas do bairro da Lixeira (Lobito)  
(fotografia original do autor)

5.1.1.3. CONTACTO COM ÁGUAS POSSIVELMENTE CONTAMINADAS COM LEPTOSPIRAS

No inquérito realizado aos participantes no estudo foram também incluídas questões sobre o seu contacto com águas, de consumo, superficiais/estagnadas, ou outras. Ao analisarmos os resultados obtidos verificou-se que 76 (54,3%) dos pacientes responderam que consumiam água de fontes e torneiras públicas e 73 (52,1%) responderam que tomavam banho e lavavam os seus veículos e roupas em lagoas, ribeiras. Cinco pacientes (três mulheres e dois homens) referiram que tinham contacto com águas residuais e seis homens responderam que praticavam pesca (Tabela B.8 e Figura B.8).

Tabela B.8 – Distribuição dos dados relativos ao contacto dos doentes com diversos tipos de águas por género

	Água não tratada	Esgotos	Pesca	Lagoas, Rios
Feminino	39	3	0	33
Masculino	37	2	6	40
Total	76	5	6	73

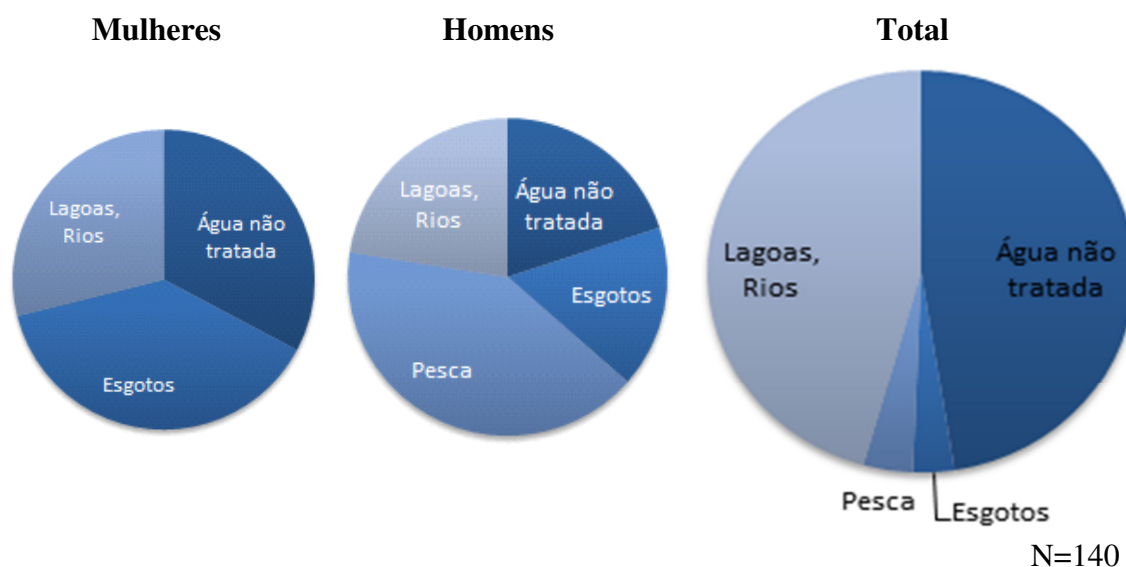


Figura B.8 – Representação gráfica dos dados obtidos relativos ao contacto com os diversos tipos de água e por género



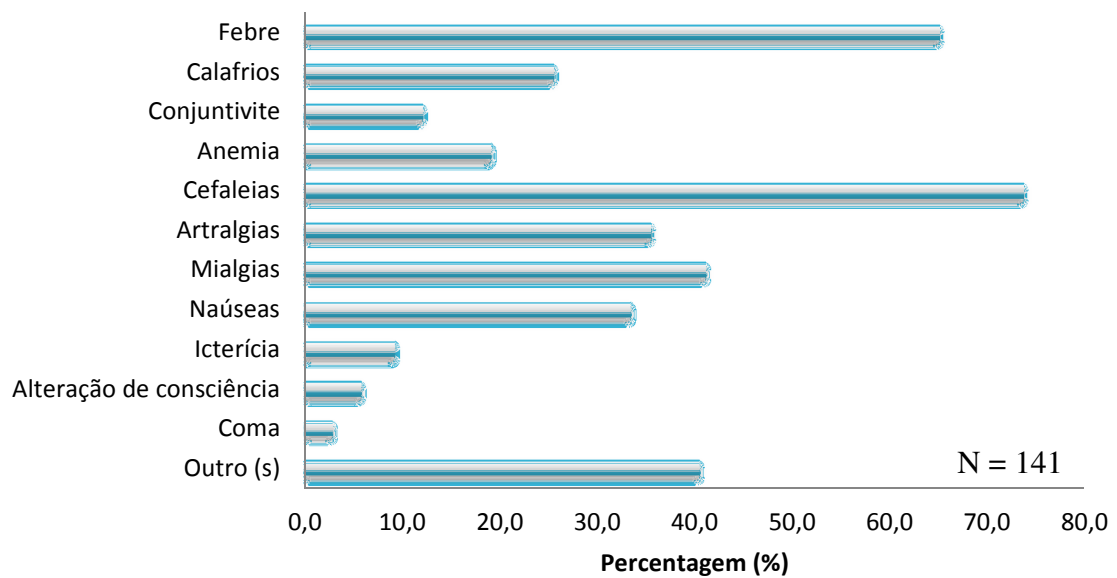
**Figura B.9** – Habitações tradicionais Angolanas Pós-Guerra e ribeira a atravessar o caminho *(fotografia original do autor)*



**Figura B.10** – Ribeira com detritos. Local de recreio de crianças *(fotografia original do autor)*

## 5.2. SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS DOS PACIENTES

No inquérito além dos aspectos epidemiológicos, foram incluídos os sinais e sintomas clínicos apresentados por pacientes cujas principais manifestações eram cefaleias e febre com diagnóstico clínico desconhecido. Após a análise dos dados obtidos (**Figura B.11**), observo que as cefaleias (73,8%), febre (65,2%), mialgias (41,1%) e náuseas (33,3%) foram os sinais mais comuns referidos pelos pacientes. Outras manifestações clínicas como icterícia, alteração de consciência e coma estiveram presentes em menos de 10% dos pacientes, como se pode observar no gráfico da **Figura B.11**.



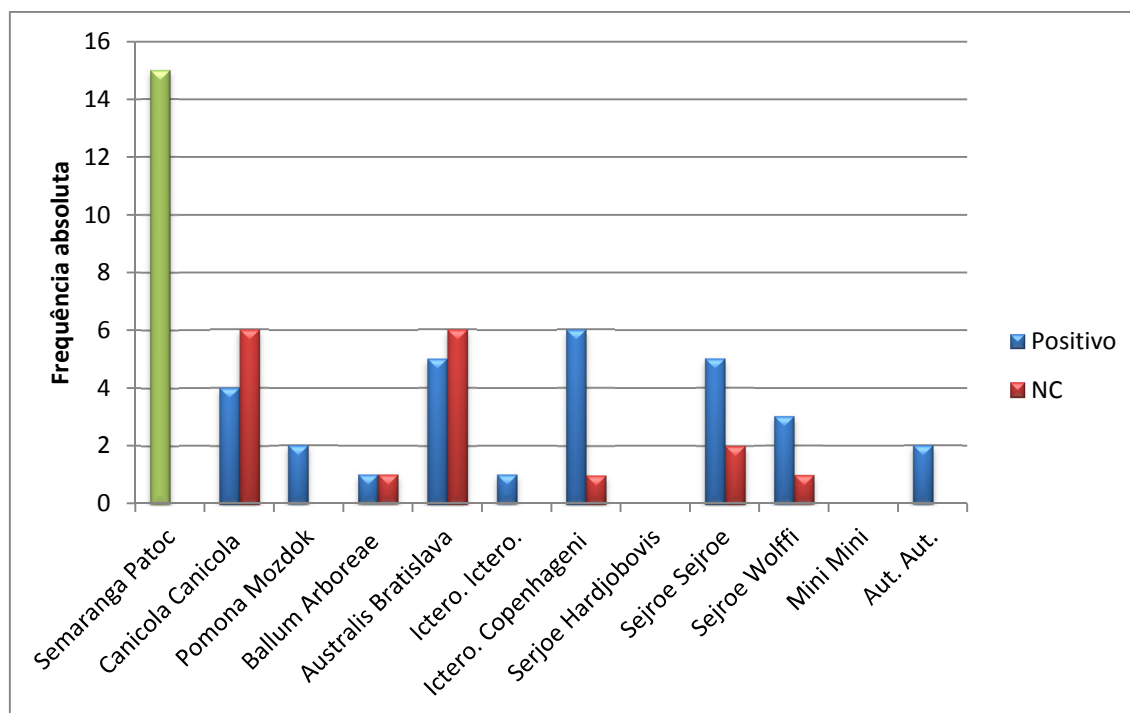
**Figura B.11** – Principais manifestações clínicas observadas nos pacientes.

### 5.3. TESTES SEROLÓGICOS

#### 5.3.1. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MACROSCÓPICA SOBRE LÂMINA (MACROLEPTO)

Na MACROLepto obtiveram-se 10% (14<sup>+</sup>/141) amostras séricas positivas e 13% (18/141) amostras não conclusivas (**Tabela B.9**).

O gráfico da **Figura B.12** mostra os resultados relativos aos antígenos (serovares) que apresentaram reacção de aglutinação, pela técnica de rastreio anteriormente mencionada, nas amostras únicas de soro obtidas dos doentes e processadas no HGL. Verificou-se que os serovares Copenhageni, Bratislava e Sejroe, pertencentes respectivamente aos serogrupos Icterohaemorrhagiae, Australis e Sejroe, foram os mais reactivos.



**Figura B.12** – Representação gráfica dos serogrupos/serovares de *L. interrogans* s.l. e *L. biflexa* s.l. (usada como “sentinela”) detectados nas amostras séricas positivas e não conclusivas pela técnica MACROLepto [Ictero – Icterohaemorrhagiae; Aut. – Autumnalis]

### 5.3.2. TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (TAM) – TÉCNICA DE REFERÊNCIA

A técnica de referência (TAM) confirmou a positividade de cinco (15,6%) das amostras inicialmente positivas por MACROLepto e apenas uma de entre as amostras foi não conclusiva (**Tabela B.9**).

Relativamente à detecção de anticorpos anti- *L. interrogans* s.l. foi possível observar em quatro amostras co-aglutinação com títulos iguais a 1:100. As restantes amostras onde foram detectadas aglutininas anti- *L. interrogans* s.l. pelo método MACROLepto apresentaram, depois, co-aglutinação pela TAM com títulos de 1:50 (reactividade *borderline*). Foi ainda observada uma amostra positiva com um título superior a 1:400 para o serogrupo Celledoni e outra com um título de 1:3200 para o serogrupo Cynopteri.

**Tabela B.9** - Resultados obtidos nos métodos de diagnóstico serológico de rastreio (MACROLepto) e de referência (TAM) [Fi – Frequência absoluta]

Métodos de Diagnóstico	Positivo		Negativo		Não Conclusivo		Total
	Fi	%	Fi	%	Fi	%	
MACROLepto	14	9,9	109	77,3	18	12,8	141
TAM	5	15,6	26	81,3	1	3,3	30

A **Tabela B.10** compara os resultados obtidos pelos dois métodos utilizados o que permitiu uma análise mais detalhada do valor diagnóstico dos testes serológicos, nomeadamente, a sensibilidade, especificidade e valores preditivos (positivo e negativo) além da avaliação da concordância entre os testes, através do teste estatístico K que mostrou um valor de 0,957.

Os resultados obtidos (**ANEXO 6**) mostraram uma sensibilidade de 100%, sendo que cinco soros positivos pela TAM foram, também, positivos por MACROLepto. Paralelamente, também se verificou que oito soros (61,5%) negativos pela TAM foram, porém, positivos pelo teste MACROLepto. O valor preditivo negativo foi de 100% e o valor preditivo positivo 38%.

**Tabela B.10** – Comparação dos resultados obtidos pelo teste MACROLepto *versus* TAM

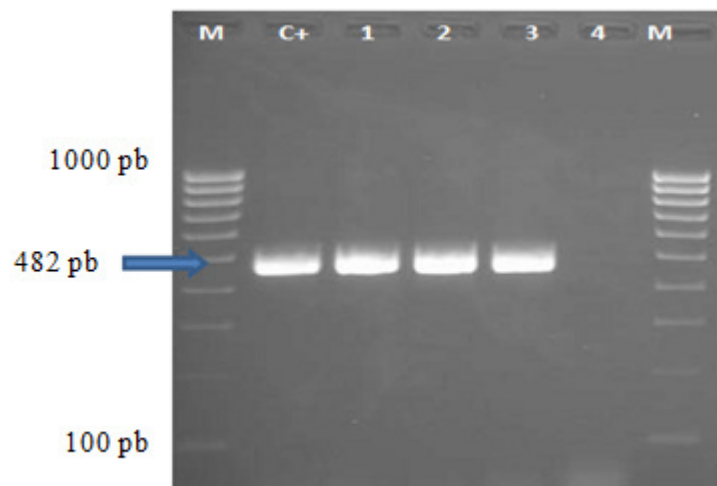
MACROLepto	TAM						
	Positivo	(%)	Negativo	(%)	Não Conclusivo	(%)	Total
Positivo	5	15,6	7	25	1	3,1	13*
Não Conclusivo	0	0	17	56,3	0	0	17*
Total	5	15,6	24	81,3	1	3,1	30

\*Uma das amostras não foi analisada pelo TAM por não estar em condições para processamento

## 5.4. TESTES MOLECULARES

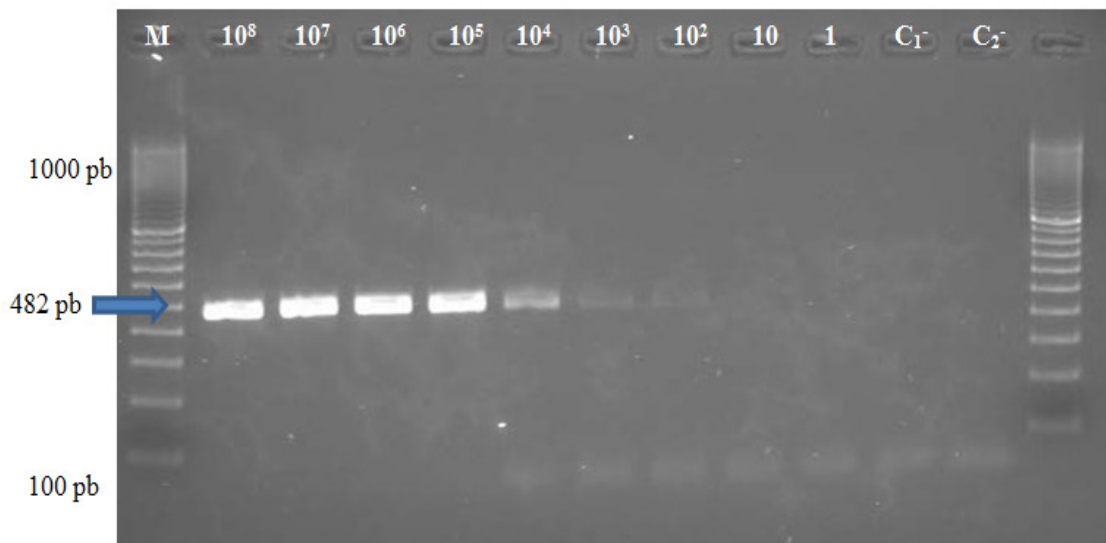
### 5.4.1. TESTES DE ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO *PRIMER* HAP 1

Na **Figura B.13** observou-se que os *primers* hap 1 são específicos para *L. interrogans* s.l., uma vez que não amplificaram o serovar Patoc da *L. biflexa* (saprófita).



**Figura B.13** – Resultado do teste de especificidade para os *primers* hap 1 (482 pb) de estirpes de *L. interrogans* s.l.. Legenda: M – Marcador molecular (100-1000 pb); C<sup>+</sup> – Controlo positivo *L. interrogans* (Ballum); 1 - Icterohaemorrhagiae (RGA); 2 – Ballum (Arborea); 3 – Pomona; 4 – Patoc (de *L. biflexa*)

A Figura B.14. exemplifica a amplificação de DNA das diversas diluições de realizadas a partir de uma cultura de leptospiras do serogrupo Ballum de *L. interrogans* s.l., a que corresponde um fragmento de 482 pb que é visível no gel de agarose 2% até  $10^2$ , o que corresponde aproximadamente a 100 leptospiras/ml. Tendo em conta que as amostras “problema” eram soros obtidos de doentes, este resultado mostrou que a PCR com estes *primers* tem maior sensibilidade do que a que utiliza os *primers* universais A e B, mesmo com recurso ao *nested*-PCR.



**Figura B.14** – Resultado do teste de sensibilidade da PCR com os *primers* hap 1 (482 pb) em diluições seriadas de uma cultura de *L. interrogans* s.l. (Ballum Ballum). Legenda: M – Marcador molecular (100-1000 pb); Ballum ( $10^8$  bactéria/ml - 1 bactéria/ml);  $C_1^-$  e  $C_2^-$  - Controlo Negativo

#### 5.4.2. AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM OS *PRIMERS* A E B

Não houve amplificação do DNA de *Leptospira* spp nas amostras estudadas com os *primers* A e B, tendo se registado apenas amplificação dos controlos positivos.

#### 5.4.3. AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM OS *PRIMERS* HAP 1

De acordo com a **Tabela B.11**, 16% ( $13^+/81$ ) amostras séricas mostraram amplificação de um fragmento específico para *Leptospira* com os *primers* hap 1. Podemos ainda observar que das amostras séricas com resultado não-conclusivo e negativo pela MACROLepto obtidas de doentes com cefaleias e/ou febre que assumiram contacto com roedores, cinco (10,2%) e seis (12,2%) foram positivas pela PCR, respectivamente.

**Tabela B.11** – Resultados de PCR (com os *primers* hap 1) em amostras inicialmente avaliadas pela técnica MACROLepto. As amostras negativas pela MACROLepto são de doentes com febre e que assumiam contacto prévio com roedores

MACROLepto	PCR				Total
	Positivo	(%)	Negativo	(%)	
Positivo	2	4,1	12	85,7	14
Não Conclusivo	5	10,2	13	72,2	18
Negativo	6	12,2	43	87,8	49
Total	13		68		81
Total (%)		16,0		84,0	



**Figura B.15** – Amplificação do DNA leptospírico com os *primers* hap 1 em soros previamente analisados por MACROLepto. Legenda: M-marcador molecular (100-1000 pb); A21, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36 – amostras de soro; N1 e N2 – Controlos Negativos da extração; C<sub>PCR</sub><sup>-</sup> – Controlo Negativo do PCR; C<sub>lep</sub><sup>+</sup> – Controlo Positivo 10<sup>7</sup> bactérias/ml (serovar Copenhageni)

Relativamente aos resultados obtidos nas amostras de urina (n=36) obteve-se detecção de DNA específico numa das amostras.

#### 5.4.4. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Dos amplicões obtidos pela PCR (com os *primers* hap 1) foram sequenciados dois, tendo sido identificados os serovares Copenhageni e Lai, pertencentes à espécie genética *L. interrogans sensu stricto* (s.s.).

**Reverse** – NNNNNNNNNNNNNNTNNGTGTAGATATTAAGCACTCTTTAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCAACCTCCTGGTTGTATATGCGCCCCACATCCTTTGCCACTTAGCATGAACTTTGGGGCCTTAAACGACGGTCTGGGCTGTTTCCCTTTTGACCACGGAGCTTATCCCCGTAGTCTGACTGCCAGTCTTTGGAGTTACGGTATTGGAAGTTTGATAGGGTTTGGTAAGCTTGTGGGCCCCCTAGTCTTTCAGAGCTCTACCCCGCAACTAAACAAGTACGCTAGGCCTAAACCTATTTGGAGAGAACCAGCTATCGCCTGCCTTGATAGGCCTTTCACCCTATCCACACCTCATCCCAATTCCTTTCAACGAAAAAGGGTTCGGTCTCCAGTGAGTTTTACCCACCTTCAACCTGGACATGGATAGCTCGACAGGATTCGGGTCAAAAAAGNAAAA

**Foward** - NNNNCNTNGNATGTGNAGCGGANANTCACTGAAGGATCTGAACCCTTTTTCGTTGAAAAGAATGGGATGAGGTGTGGATAGGGGTGAAAGGCCTATCAAGGCAGGCGATAGCTGGTCTCTCCGAAATAGTTAGGCTAGCGTCAAGTGTAGTTAGTTGCGGGGTAGAGCTCTGAAAGGACTAGGGGGCCACAAGCTTACCAAACCCTATCAAATTCGAATACCGTAACTCCAAAGACTGGCAGTCAGACTACGGGGGATAAGCTCCGTGGTCAAAGGGAAACAGCCCAGACCGTGTGTTAAGGCCCAAAGTTCATGCTAAGTGGCAAAGGATGTGGGGGCGCATATACAACCAGGAGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCCTAATAGCTACTGGTGCAGTGTCCCGCGCGAAAATGTAATCGGACTAAGCATGGCATACTCGGATTCGCGTGGCGTGAAAAAAA

**Figura B.16** – Sequência obtida dos amplicões sequenciados, correspondentes aos serovares Copenhageni e Lai de *L. interrogans* s.s.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objectivo estimar a ocorrência da Leptospirose humana no Lobito (Angola) através de métodos de diagnóstico serológico e molecular, a partir de uma amostra da população com cefaleias e sintomas febris que deram entrada no Hospital local. Deste modo, realizou-se um estudo epidemiológico na referida população através de um inquérito preparado para o efeito e da pesquisa de aglutininas específicas para *L. interrogans* s.l. nos soros obtidos, através de duas técnicas: a MACROLepto (concretizada em campo) e a TAM (realizada em Lisboa no IHMT). Em paralelo, procedeu-se à pesquisa por métodos moleculares (PCR) de DNA leptospírico, em particular, nos casos negativos pelos métodos anteriores, de forma a obter-se uma avaliação polifásica.

O estudo serológico realizado com a técnica de referência - TAM - incluiu todos os indivíduos (pacientes) positivos, assim como os considerados não-conclusivos pré-analisados pelo método MACROLepto. Esta última técnica mostrou uma sensibilidade muito elevada (100%) e uma especificidade de ordem dos 68%. Os resultados seronegativos obtidos pela referida técnica não foram confirmados pela técnica de referência, de acordo com os critérios estabelecidos no laboratório do IHMT.

A Leptospirose é um problema de Saúde Pública emergente no Mundo, porém a situação epidemiológica no Continente Africano é pouco conhecida (Pappas *et al.*, 2007). Apenas se conhece a respectiva incidência em alguns países, e noutros só se sabe da sua existência devido às notificações de pequenos surtos (Machang'u *et al.*, 2004; Mgone *et al.*, 2006; Gatley, 2009). Assim, o conhecimento da situação da Leptospirose em África, com base nas taxas de prevalência, irá contribuir para uma nova abordagem da doença face às patologias que cursam com febre existentes em regiões tropicais e para o estabelecimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento clínico.

Até ao presente estudo, em Angola não existem dados sobre a situação da Leptospirose no país, devido ao facto da doença ser diagnosticada pelos clínicos de forma presuntiva (não sendo confirmada laboratorialmente) e, também, devido às

dificuldades logísticas e de execução que a técnica laboratorial de referência exige. Este é um trabalho pioneiro que permitiu i) estimar e conhecer a frequência da doença; ii) detectar presuntivamente os serovares infectantes circulantes; iii) compreender os quadros clínicos associados, bem como a identificação das fontes potenciais de contágio.

No decorrer da presente investigação e relativamente à caracterização da amostra populacional do estudo, verificou-se um paradoxo quanto ao género predominantemente afectado pela doença em relação a outros estudos no âmbito da Leptospirose. Em diversos estudos epidemiológicos da doença observa-se maior frequência de casos em homens que se encontram na faixa etária activa, porque muitas vezes estes praticam actividades ocupacionais e/ou recreativas que favorecem o contacto com fontes de risco, como: águas e/ou solos contaminados (Leshem *et al.*, 2010).

É disto exemplo um estudo realizado em Portugal (Açores) por Vieira (2006), em que se observou serem os homens em idade activa os mais afectados, assim como as mulheres idosas que realizavam actividades agrícolas em terras contaminadas. Todavia, no nosso estudo observou-se, ao invés, maior número de casos em mulheres em idade activa. Em muitos países em desenvolvimento são as mulheres que realizam as actividades domésticas e rurais, e que têm pouca ou nenhuma formação académica (Ashford *et al.*, 2000). Angola não é excepção, sendo também a elas quem cabe assegurar o sustento da família. Assim sendo, as mulheres em Angola poderão ser a população mais susceptível à infecção por leptospiras.

A doença está, como se sabe, directamente relacionada com a exposição a águas contaminadas e animais infectados, sendo os indivíduos que exercem actividades pecuárias e de agricultura os que correm maior risco de exposição às leptospiras (Zackeri *et al.*, 2010). De acordo com os dados epidemiológicos recolhidos, a maioria dos doentes exerciam actividades não directamente relacionadas com esse risco. Porém, é de salientar que cerca de 14% admitem ter tido, em determinados períodos, contacto com roedores e cerca de 10% responderam que têm contacto com cães, por vezes fora das suas habitações. Acresce dizer que os africanos, e neste caso, os angolanos, têm um sentido familiar muito forte e, muitas vezes, convivem entre si em habitações com condições higieno-sanitárias deficitárias.

Um outro grupo predominante no estudo e que é relevante discutir é o grupo constituído por camionistas e “motoqueiros”. Estes trabalhadores, apesar de não trabalharem na agricultura, que é a profissão com maior risco de infecção, partilham o mesmo risco de exposição através de águas contaminadas (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Neste grupo, a maioria admitiu ingerir águas impróprias durante longos percursos, devido à falta de acesso a água potável, além de ter contacto com águas superficiais para a lavagem das suas viaturas.

É de salientar que a exposição da população a águas estagnadas em países tropicais, também é justificada pela época das “chuvas”, que apresenta um risco elevado para a população em geral no seu dia-a-dia e em particular para as crianças que são, particularmente, vulneráveis (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Vieira, 2006; McGrowder e Brown, 2010).

De acordo com o que se observa no terreno, as crianças são quem tem mais comportamentos de risco, não só porque praticam actividades recreativas nas águas estagnadas, como fazem as suas necessidades fisiológicas em águas próximas de lixeiras, nas margens de ribeiros perto das suas habitações, e ainda, andam a maior parte do tempo descalças (Tullu e Karande, 2009). Dos resultados dos testes laboratoriais realizados obteve-se, apenas, um doente seropositivo com 15 anos. Contudo, os autores McGrowder e Brown num estudo realizado em 2010 numa população pediátrica, obtiveram, apenas, dois casos seropositivos, tendo concluído que a ausência de casos de Leptospirose em crianças poderá dever-se ao facto da doença assumir uma forma assintomática neste grupo etário (Yersin *et al.*, 1998).

No que respeita ao contacto com animais infectados, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, existe sempre a possibilidade de exposição da população humana com esse contacto (Levett, 2001). Com efeito, foi possível verificar que a maioria dos pacientes do estudo comentavam terem tido contacto com alguns mamíferos, como os roedores e canídeos. A exposição a roedores é o principal factor de risco de infecção por leptospirosas, uma vez que estes animais são reservatórios por excelência destas bactérias, excretando-as permanentemente pela urina, especialmente as pertencentes aos serogrupos mais severos (Faine, 1982; Monahan *et al.*, 2009; Victoriano *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2010). Neste sentido é

importante reforçar a necessidade de desenvolver programas de controlo para reduzir o risco da doença em humanos (Vieira, 2006).

Relativamente, aos canídeos que são comumente infectados pelos serovares com distribuição universal, como a *Canicola* e a *Icterohaemorrhagiae*, observou-se alta prevalência destes animais quando ocorrem surtos de Leptospirose em humanos (Faine, 1982; Vijayachari *et al.*, 2008; Gatley, 2009).

Outros estudos epidemiológicos no âmbito da Leptospirose (Campagnolo *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2007; Vijayachari *et al.*, 2008) realizados em suínos e bovinos demonstraram a importância destes como responsáveis pela disseminação de leptospiras causais da “Doença das Chuvas” em humanos. Porém, no nosso estudo tivemos, apenas, um indivíduo que assumiu contacto com bovinos e 5% referiu contacto com suínos. O indivíduo que teve proximidade com bovinos foi seropositivo e habitava numa região rural. Este não só admite proximidade com este animal como com os restantes incluídos no inquérito. Este aspecto está de acordo com o estudo realizado por Zackeri *et al.* (2010) que verificou que todos os casos positivos provinham de pacientes que tiveram contacto directo com animais e que realizavam actividades ocupacionais com permanente exposição a águas contaminadas com urina de animais infectados. Obteve-se, ainda, um número elevado de doentes que referiram contacto com outros animais, sobretudo ovinos. Apesar destes não estarem incluídos no inquérito, o facto dos doentes os terem referido é, também, um dado importante, uma vez que estes animais são, também, hospedeiros de leptospiras, excretando-as igualmente pela urina, tal como os roedores (Adler *et al.*, 2010).

A exposição da população a águas contaminadas é outro dado importante, já que estas são um factor de risco elevado (Zaki e Sheih, 1996; WHO, 2000; Sehgal, 2000). Num estudo realizado por Ooteman *et al.* (2006) verificou-se uma elevada taxa de doentes confirmados para Leptospirose que habitavam em regiões urbanas com falta de saneamento básico e que recorriam à utilização de águas estagnadas para uso corrente. Neste contexto, observou-se no nosso estudo que dos 76 pacientes que ingeriam água imprópria para consumo, 4% foram positivos por TAM e 14% por MACROLepto. Para aqueles que se banhavam ou utilizavam águas de pequenas lagoas e ribeiros observou-se que 5% foram positivos pelo TAM e 12% por PCR. Estes resultados vêm a confirmar

o reconhecido risco de exposição a águas contaminadas com a consequente infecção por leptospiros (Bovett *et al.*, 1999; WHO 2000).

O quadro clínico da Leptospirose varia entre síndrome gripal e doença fulminante. A confirmação laboratorial é fundamental, como já referido, para se obter um diagnóstico definitivo, dado o polimorfismo clínico da doença, que por sua vez depende de diversos factores, tais como o serovar infectante, a concentração do inóculo, a susceptibilidade do hospedeiro, ou da combinação de todos estes factores (Faine *et al.*, 1999; Vieira, 2006).

O sinal clínico “cefaleias” foi um dado “major” decisivo na nossa investigação. O início da doença surge repentinamente com febre, dando origem a dores de cabeça intensas e dores no corpo. Em alguns casos o primeiro sintoma é cefaleia persistente severa (Ooteman *et al.*, 2006; Vieira, 2006; Vijayachari *et al.*, 2008; Fraga *et al.*, 2011). No nosso estudo, alguns dos doentes que tinham cefaleias comentavam a existência de febre durante períodos nocturnos, recorrendo à toma de antipiréticos. Estes aspectos reflectem os resultados positivos obtidos pelos métodos serológicos e moleculares. Os doentes que tinham febre, 80% (4/5) foram positivos por TAM e 69% (9<sup>+</sup>/13) por PCR. Relativamente ao sintoma “cefaleias” os valores são iguais pelo método de PCR. Os dados clínicos estão de acordo com outros estudos que demonstram a correlação existente entre o síndrome febril e a confirmação laboratorial da Leptospirose (Leshem *et al.*, 2010).

A doença em estado avançado é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculite, danos endoteliais, hemorragias, petéquias e compromisso de alguns órgãos que dão origem a algum grau de icterícia e falência multiorgânica (Levett, 2001). O valor da hemoglobina, assim, pode ser um indicador do estado do paciente e na fase da doença em que o doente se encontra, permitindo alguma orientação aos clínicos. No nosso estudo observam-se valores inferiores a 11 g/dL nos casos positivos para Leptospirose (pelos métodos serológicos e por PCR), o que pode estar de acordo com o quadro clínico de Leptospirose dos referidos doentes.

Dadas as dificuldades existentes na classificação das leptospiros, pela coexistência de um método taxonómico convencional com base na serologia, e outro genético, recorreu-se da presença de anticorpos anti- *Leptospira interrogans* s.l. existentes nos

soros humano e quer à amplificação de DNA leptospírico por PCR com os pares de *primers* A/B e hap1. Em primeira análise, no método MACROLepto obtiveram-se 10% de amostras positivas de três serovares distintos, Copenhageni (43%), Australis (36%) e, também, Sejroe (36%). Estes serovares admite-se que estejam a ser dispersados por roedores e o serovar Sejroe por cães e/ou bovinos, dando ênfase aos dados anteriormente discutidos sobre o contacto com animais infectados (Vieira, 2006). Estes resultados confirmam que a prevalência de diferentes serovares na população humana depende dos reservatórios animais existentes como, por exemplo, a relação ubíqua entre a espécie animal *Rattus rattus* e o serogrupo Icterohaemorrhagiae (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

No nosso estudo, a confirmação laboratorial destes resultados pela técnica de referência foi fundamental para eliminar possíveis falso-positivos, visto que a técnica anteriormente mencionada é, apenas, de rastreio. Dos soros positivos e não-conclusivos pelo método de rastreio foram confirmados pela TAM 16% como positivas, tendo sido consideradas positivas as amostras com títulos superiores ou iguais a 1:100 (WHO, 2000). De acordo com Faine e seus colaboradores (1999), os títulos anti-*Leptospira* podem permanecer baixos durante meses ou anos, sendo necessário utilizar diferentes titulações começando pela mais baixa (1:50), diminuindo a possibilidade de existir reacções cruzadas, e assim melhorar a sensibilidade da técnica. Todas as nossas amostras positivas tiveram títulos iguais e superiores a 1:100. Contudo, na TAM, as amostras consideradas negativas mostraram reactividade na diluição 1:50, o que traduziu um resultado *borderline*. Uma possível explicação para esta observação é comentada por Branger e colaboradores (2005) sobre o “Efeito Vacinal” existente em regiões endémicas onde a população tem um convívio constante com ambientes contaminados o que poderá propiciar uma protecção cruzada contra um leque de variados serovares de *Leptospira*. Por sua vez, a administração de antibióticos, por atrasar a resposta humoral, conduz à obtenção de títulos baixos, o que poderá ser outra possível explicação (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Por outro lado, a ausência de segundas amostras de soro e o desconhecimento dos serovares mais prevalentes na região, não permitiu que os nossos resultados fossem superiores aos obtidos.

Sabe-se que o período favorável para a detecção de anticorpos anti- *L. interrogans* s.l. ocorre entre o oitavo e o décimo dia após o começo da doença (Ooteman *et al.*, 2006), situação que observámos nos nossos resultados positivos pela técnica de referência. No estudo realizado por Zackeri *et al.* (2010) todas as amostras colectadas entre o segundo e quarto dia após o início dos sintomas da doença, mostraram que em 60% das amostras confirmadas à *posteriori* por TAM foram inicialmente positivas por PCR, assumindo-se que esta técnica é capaz de detectar leptospiros (o seu DNA) durante a primeira semana da doença, antes de serem detectados anticorpos no sangue, que só surgem após o oitavo dia (Villumsen *et al.*, 2010). No âmbito da nossa investigação observaram-se resultados análogos, já que, das amostras seronegativas por TAM, cerca de 17% que amplificaram na PCR foram colhidas antes do sétimo dia.

No que respeita à abordagem molecular, a técnica de PCR com os *primers* (hap 1) específicos para leptospiros patogénicas, consegue ser um método rápido e simples comparativamente ao método convencional. Contudo, comprovámos que a PCR não é o teste ideal se utilizado isoladamente para o diagnóstico. Quando associado a técnicas serológicas ajuda na detecção do maior número de casos, sobretudo tendo em consideração o tempo de evolução da doença, tal como referido por Shekatkar e colaboradores (2010).

Verificou-se, também, a importância da sensibilidade do par de *primers* seleccionados. A escolha dos *primers* hap 1 demonstrou resultados superiores aos de outros protocolos, como os que utilizavam os *primers* A/B, que por serem universais têm a desvantagem de detectar DNA de leptospiros patogénicas e saprófitas, e os *primers* G1 e G2 que dentro das patogénicas apenas detectam DNA de alguns serovares de *Leptospira* (Faria *et al.*, 2008). Neste estudo, o protocolo que utilizou os *primers* A/B não conseguiu amplificar nenhuma amostra, o que poderá dever-se, não só à baixa sensibilidade da técnica como, também, ao baixo rendimento de DNA obtido na extracção. No protocolo com os *primers* hap 1 que têm um grau de sensibilidade superior ao dos *primers* anteriormente mencionados, os resultados foram muito mais consentâneos com o que era esperado.

Relativamente aos resultados da PCR nas amostras de urina, apenas se observou presença de DNA numa amostra, o que pode ser justificado pela fase da doença nesse paciente. Admite-se que as amostras obtidas possam não corresponder à fase de leptospirúria e por isso a probabilidade de encontrar o respectivo DNA ser diminuta, isto é, a quantidade de leptospiras existentes na urina ser tão pequena que inviabiliza a detecção molecular pretendida (Ooteman *et al.*, 2006).

Por último, a determinação dos serovares Copenhageni e Lai de *L. interrogans* sensu stricto por sequenciação de duas amostras positivas pela PCR foi um achado, também, pioneiro. O serovar Copenhageni, pertencente ao serogrupo Icterohaemorrhagiae que está relacionado com a doença de Weil (casos severos) e poderá dar-nos, também, a indicação das espécies de roedores mais prevalentes na região (Hartskeerl *et al.*, 2011). O serovar Lai pertence igualmente ao serogrupo Icterohaemorrhagiae, tratando-se de um serovar com carácter altamente patogénico.

Por outro lado, os serovares Lai e Copenhageni foram os primeiros a terem o genoma integralmente sequenciado, o primeiro em 2003 por Ren e colaboradores e o segundo um ano mais tarde por Nascimento *et al.*, 2004.

Estes achados são de grande importância, porque o conhecimento de dois serovares altamente patogénicos a circular na região de Lobito (Benguela), obriga, necessariamente, a futuros estudos clínico-epidemiológicos a desenvolver nessa e noutras regiões de Angola.

## 7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo procurou, assim, contribuir para o conhecimento da Leptospirose em Lobito (Angola), através da conjugação de uma abordagem integrada (epidemiológica, clínica e laboratorial) e, deste modo, estimular as Autoridades de Saúde e os Clínicos a pensarem, também, nesta patologia face a pacientes com síndrome febril e cefaleias com diagnóstico desconhecido.

Através dos dados obtidos nesta investigação podemos concluir que:

- i) As mulheres em Angola são mais susceptíveis à doença do que os homens, devido às suas actividades diárias;
- ii) As ocupações profissionais ligadas ao contacto com águas, possivelmente contaminadas, são as que apresentam maior risco de infecção;
- iii) A informação epidemiológica sobre o doente é fundamental para chegar a um diagnóstico preciso de Leptospirose, uma vez que grande parte dos indivíduos infectados assumem contacto com roedores, canídeos e ovinos, e estão constantemente expostos a águas superficiais, devido às condições higieno-sanitárias ambientais, sobretudo na época das chuvas;
- iv) A utilização integrada das técnicas serológicas e moleculares é útil na detecção de maior número de casos;
- v) Houve concordância entre os testes serológicos utilizados;
- vi) A prevalência da Leptospirose é moderada na população estudada da região alvo do estudo;
- vii) A seroprevalência de serovares virulentos na região (Copenhageni e Lai) obriga a uma maior atenção por parte das Autoridades de Saúde quanto à Leptospirose.

Em termos futuros, este estudo abre perspectivas para alguns aspectos fundamentais que deveriam ser igualmente estudados, a identificação das espécies dos reservatórios silváticos e o isolamento de leptospiras circulantes. Estes dados poderão contribuir para testes serológicos mais sensíveis e específicos e, ainda, incrementar protocolos de prevenção e controlo de Saúde Pública para a população angolana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

**Abela-Ridder** B, Sikkema R, Hartskeerl RA. (2010). Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents*, **36S**: S5-S7.

**Adler** B, Chappel RJ, Faine S. (1982). The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentbl Bakteriol*, **252**: 405-413.

**Adler** B, de la Peña Moctezuma A. (2009). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, **140** (3-4): 287-96.

**Ashford** DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, Plikaytis B, Jarquin C, De Lose Reyes JO, Amador JJ. (2000). Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*, **63** (5-6): 249-54.

**Bharti** AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM; Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, **3** (12): 757-771.

**Bovet** P, Yersin C, Merien F, Davis CE, Perolat P. (1999). Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol*, **28** (3): 583-90.

**Branger** C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. (2001). Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus – mediated vaccination. *Infect Immun*, **69**: 6831-6838.

**Brown** PD, Gravekamp DG, Carrington H van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. (1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*, **43** (2): 110-114.

**Campagnolo** ER, Warwick MC, Marx HL Jr, Cowart RP, Donnell HD Jr, Bajani MD, Bragg SL, Esteban JE, Alt DP, Tappero JW, Bolin CA, Ashford DA. (2000). Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *J Am Vet Med Assoc*, **216** (5): 676-82.

- Carreira T.** (2009). Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da Leptospirose Humana. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp.81.
- Collares-Pereira M.** (1992). Contribuição para o Estudo do género *Leptospira* em Portugal. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp. 300.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** (1999). *Leptospira* and leptospirosis. 2<sup>nd</sup> (ed), Melbourn /Vic. Australia: MediSci, pp. 272.
- Faine S.** (1982). Guidelines for the control leptospirosis. Faine S. (Ed.). WHO Offset Publication, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Faria MTd, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG.** (2008). Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica*, **108**: 1-5.
- Farr RW,** (1995). Leptospirosis. *Clin Infect Dis*, **21 (1)**: 1-6.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L.** (2011) Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*, **73 (5)**: 408-19.
- Garrity GM, Winters M, Searles DB.** (2001). Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology*, Second Edition.
- Gatley JM.** (2009). The prevalence of *Leptospira* serovars causing infection in dogs in South Africa. Dissertação de Mestrado, Universidade de Pretoria, África do Sul, pp. 65.
- Gonçalves T.** (2009). Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* spp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, pp. 135.
- Haeckel EH.** (1894). *Systematische Phylogene der Protisten und Pflanzen*, I.G. Reimer, Berlin, pp. 40.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis BA.** (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis – dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, **17**: 494-501.

- Hernández-Rodríguez P**, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods*, **84 (1)**: 1-7.
- Lau CL**, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. (2010). Climate change, flooding, urbanization and leptospirosis: fuelling the fire?. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **104 (10)**: 631-8.
- Leshem E**, Segal G, Barnea A, Yitzhaki S, Ostfeld I, Pitlik S, Schwartz E. (2010). Travel – Related Leptospirosis in Israel: a nationwide study. *Am J Trop Med Hyg*, **82 (3)**: 459-463.
- Levett, P.N.** (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, **14**: 296-326.
- Machang'u RS**, Mgode GF, Assenga J, Mhamphi G, Weetjens B, Cox C, Verhagen R, Sondij S, Goris MG, Hartskeerl RA. (2004). Serological and molecular characterization of *Leptospira* serovar Kenya from captive African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*) from Morogoro Tanzania. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **41(2)**: 117-121.
- McGrowder D**, Brown P. (2010). Clinical and laboratory findings in patients with leptospirosis at a tertiary teaching hospital in Jamaica. *Dove Medical Press*, **1**: 59-64.
- Merien F**, Amouriauz P, Perolat P, Baranton G. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, **30**: 2219-2224.
- Mgode GF**, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Hartskeerl RA. (2006). New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**: 593-597.
- Monahan AM**, Miller IS, Nally JE. (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol*, **107 (3)**: 707-16.
- Ooteman MC**, Vago AR, Koury MC. (2006). Evaluation of MAT, IgM, ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*, **65 (2)**: 247-257.
- Pappas G**, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. (2008). The globalization of leptospiroses: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis*, **12 (4)**: 351-7.
- Pavli A**, Maltezou HC. (2008). Travel-Acquired Leptospirosis. *J Travel Med*, **15 (6)**: 447-53.

**Ren SX**, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, **422 (6934)**: 888-93.

**Saier MH**, Garcia-Lara J. (2001). *The spirochetes: molecular and cellular biology*. Horizon Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom, pp.87

**Sehgal SC**. (2000). Leptospirosis on the horizon. *Natl Med J India*, **13 (5)**: 228-30.

**Shekatkar S**, Harish BN, Parija SC. (2010). Diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. *Inter Journ Phar Bio Scie*, **1 (3)**: 975-6299

**Soto FR**, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, Bernarsi F, Camargo SR. (2007). Leptospire Suína. *Arq Inst Biol*, **74 (4)**: 379-395.

**Thursfield M**. (ed). 1985. *Veterinary Epidemiology*. 2<sup>nd</sup> Edition, Blackwell Science Ltd. London. UK. pp. 37-56.

**Tullu MS**, Karande S. (2009). Leptospirosis in children: a review for family physicians. *Indian J Med Sci*, **63 (8)**: 368-78.

**Victoriano AF**, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S, Adler B. (2009). Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis*, **9**: 147.

**Vieira ML**. (2006). Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospire em áreas endémicas. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp. 300.

**Vijayachari P**, Sugunan AP, Shriram A. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*, **33 (4)**: 557-569.

**Villumsen S**, Perdesen R, Krogfelt KA, Jensen JS. (2010). Expanding the Diagnosis use of PCR in Leptospirosis: Improved method for DNA extraction from blood cultures. *Plos One*, **5 (8)**: 12095.

**Wheeler R.** (2006). Diagram showing the light path in a dark field microscope. Zephyris. ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dark\\_Field\\_Microscope.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dark_Field_Microscope.png)).

**WHO**, World Health Organization. (2000). As of 21 September, 6 suspected cases of leptospirosis associated with the Eco-Challenge sports event have been reported in Canada. (<http://faz.org/ahead/disease/lept/2000/>).

**WHO/ILS** (WORLD HEALTH ORGANIZATION/INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY). (2003). Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. pp. 109.

**Woese CR**, Kandler O, Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 4576-4579.

**Yersin C**, Bovet P, Mérien F, Wong T, Panowsky J, Perolat P. (1998). Human Leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. *Am J Trop Med Hyg*, **59** (6): 933-940.

**Zackeri S**, Sepahian N, Afsharpad M, Esfandiari B, Ziapour P, Djadid ND. (2010). Molecular epidemiology of Leptospirosis in Northern Iran by nested polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism and sequencing methods. *Am J Trop Med Hyg*, **85** (5): 899-903.

**Zaki SR**, Shieh WJ and the Epidemic Working Group. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua. *Lancet*, **347**: 535.

# **Anexos**

## **Anexo 1**



Hospital Regional do Lobito—Angola  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Nº do Processo \_\_\_\_\_

Nº da Amostra \_\_\_\_\_

## Inquérito Prospectivo Da Leptospirose

2010/2011

Iniciais do Nome do Paciente \_\_\_\_\_ Sexo  F  M  
Data Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_  
Ocupação \_\_\_\_\_ Localidade de habitação \_\_\_\_\_  
Origem do doente: Zona Urbana  Zona Rural   
Nome do Médico assistente \_\_\_\_\_

### INFORMAÇÃO CLÍNICA RELEVANTE

Início dos sintomas \_\_\_\_\_ dias

Medicação antes da actual consulta

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

#### Sinais e Sintomas

[assinalar com uma X a(s) opção(ões) conveniente(s)]

Febre (in edida)		Dores musculares		Alterações de consciência	
Calafrios		Dores nas articulações		Sinais meningéus	
Conjuntivite		Náuseas		Coma	
Anemia		Ictericia		Outros	
Dores de Cabeça		Fotofóbias			

Diagnóstico Clínico (antes do diagnóstico laboratorial) \_\_\_\_\_

### INFORMAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Contacto com Animais		Contacto com Água	
Ratos	( )	Água não tratada (bebida)	( )
Bovinos	( )	Esgotos	( )
Porcos	( )	Pesca	( )
Cães	( )	Lagoas, Rios, Tanques, Poços	( )
Outro	_____	Outro	_____

### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL da Leptospirose (a preencher no laboratório)

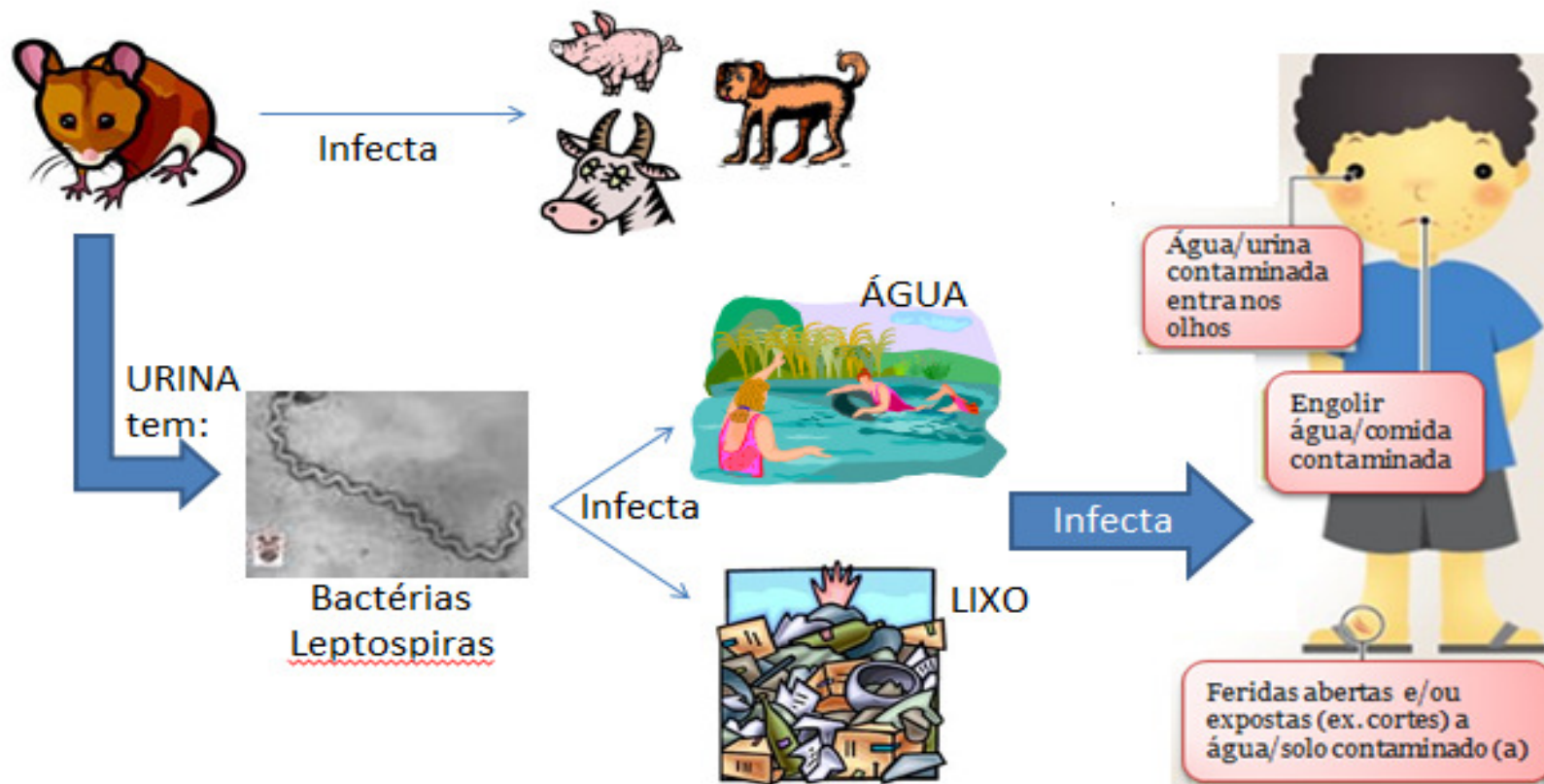
Data da colheita: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Amostra biológica \_\_\_\_\_ Sangue \_\_\_\_\_ Urina \_\_\_\_\_

Colúria/Bilirrubinúria		Creatinina elevada		Trombocitopenia	
TGO elevada		Estróciolos		Hemoglobina	
TGP elevada		Leucocitose/Neutrofilia		Outros	
Ureia elevada		T. Protrombina			

# **Anexo 2**

# Como se apanha Leptospirose?



# Anexo 3



Hospital Regional do Lobito—Angola  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

*“ Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na Região do Lobito: aplicação de métodos de diagnóstico serológico e/ou molecular ”*

**Formulário do Consentimento Informado**

**2010/2011**

**Qual é o problema que queremos estudar?**

A Leptospirose é uma doença transmitida por micróbios que estão na urina dos ratos, que podem estar em muito sítios, na água, na terra, nas garrafas ou latas de refrigerante, etc. Além dos ratos outros animais, como os cães, as vacas, os cavalos e os porcos também podem passar estes micróbios e causar doença às pessoas. Os canos da água rotos ou ferrentos a chuva e o calor, levam os micróbios a passar para as pessoas e causar a doença. A doença pode matar e dar mau estar iguais ao paludismo, como ter febre.

Nós queremos se há esta doença no Lobito. Para isso precisamos de um bocadinho de sangue e urina (xi-xi) e fazer algumas perguntas.

**O que vamos fazer com o sangue e o xi-xi?**

O bocadinho de sangue e o xi-xi vão ser vistos no laboratório e o que for visto será dito ao médico.

**Sou obrigado/a a participar?**

Só se quiser. Não é obrigado/a a dar o bocadinho de sangue nem do xi-xi, mas é visto pelo médico na mesma e tem remédios na mesma.

**Terei algum risco ou transtorno?**

Entrar no estudo não lhe trará qualquer risco ou transtorno, porque é habitual no hospital tirarem um bocadinho de sangue e pedir para fazer xi-xi para ver se está doente. Também não vamos dizer o seu nome a ninguém, ficará segredo, só o médico é que vai saber.

**Vou ter alguma recompensa?**

Fica a saber se os seus maus estares são desta doença e o médico pode tratar.  
Se entrar no estudo isso vai ajudar a que outras pessoas também possam ser curadas.

**O que é que acontece quando o estudo acabar?**

Os resultados são dados ao Hospital e às autoridades de saúde e serão apresentados em reuniões para informar as pessoas que o xi-xi dos ratos também causa doença nas pessoas que moram no Lobito.

*Se não entendeu bem, por favor fale com o médico responsável.*

**Contactos do Médico Responsável pelo estudo**

Nome:

Morada:

Telefone:

Telefone do gabinete no Hospital:



Hospital Regional do Lobito—Angola  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Nº do Processo \_\_\_\_\_  
Nº da Amostra \_\_\_\_\_

*“ Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na Região do Lobito: aplicação de métodos de diagnóstico serológico e/ou molecular ”*

**Formulário do Consentimento Informado**

**2010/2011**

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

Fui convidado/a para participar no estudo “Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito” e compreendo que é preciso um pouco de sangue e de urina (xi-xi) e de algumas informações das minhas queixas (mal-estar). Foi-me dito que entrar no estudo isto não me faz mal. E fiquei a saber que no caso de ter esta doença vou ser tratado pelo médico. Sei também que não me vão dar dinheiro por eu entrar no estudo. Esta informação foi-me lida e explicada pelo médico que me viu. Todas as perguntas que fiz foram dadas com clareza. Aceito entrar no estudo.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

No me do participante \_\_\_\_\_

Assinatura do participante \_\_\_\_\_

*(ou impressão digital se não souber assinar)*

Assinatura do Médico Assistente \_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

O/a meu/minha filho/a foi convidado/a para participar no estudo “Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito” e compreendo que é preciso um pouco de sangue e de urina (xi-xi) e de algumas informações das minhas queixas (mal-estar). Foi-me dito que entrar no estudo não irá fazer mal da minha criança. E fiquei a saber que no caso da minha criança ter esta doença vai ser tratada pelo médico. Sei também que não me vão dar dinheiro por o meu/minha filho/a entrar no estudo. Esta informação foi-me lida e explicada pelo médico que me viu. Todas as perguntas que fiz foram dadas com clareza. Aceito entrar no estudo.

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

No me do participante \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

*(ou impressão digital se não souber assinar)*

Assinatura do Médico Assistente \_\_\_\_\_

# Anexo 4

## TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MACROSCÓPICA EM LÂMINA (MACROLepto)

(adaptado de Gonçalves, 2004)

**Material (reagentes, material biológico e equipamento):**

### 1ª Etapa: Preparação do Antigénio

#### A. Sementeira (sub-cultura)

1. Seleccionar uma cultura jovem e densa ( $10^8$  bact./ml) com cerca de 13 dias de crescimento observando-se, posteriormente, no microscópio de campo escuro;
2. Semear (inocular) 23 gotas da cultura seleccionada em três tubos de ensaio contendo 7-8 ml de EMJH líquido;  
Os tubos de ensaio são mantidos em agitação permanente numa incubadora orbital entre 28-30°C de temperatura;
3. Preparar 2 litros de meio de cultura EMJH líquido;
4. Distribuir 50 ml do meio preparado por frascos de cultura;
5. Semear o volume (cultura) de cada tubo num frasco de cultura com EMJH líquido. Os referidos frascos são colocados na incubadora orbital em permanente agitação à temperatura de 28-30°C;

#### B. Recolha do Antigénio

1. Proceder à leitura da respectiva densidade por espectrofotometria ( $2 \times 10^8$  bact./ml) ou numa câmara de Petroff-Hauser
2. Adicionar 1,32 ml de formol a 40% a cada frasco de cultura e deixar *overnight* a 4°C
3. Distribuir a cultura inactiva em tubos para posterior centrifugação

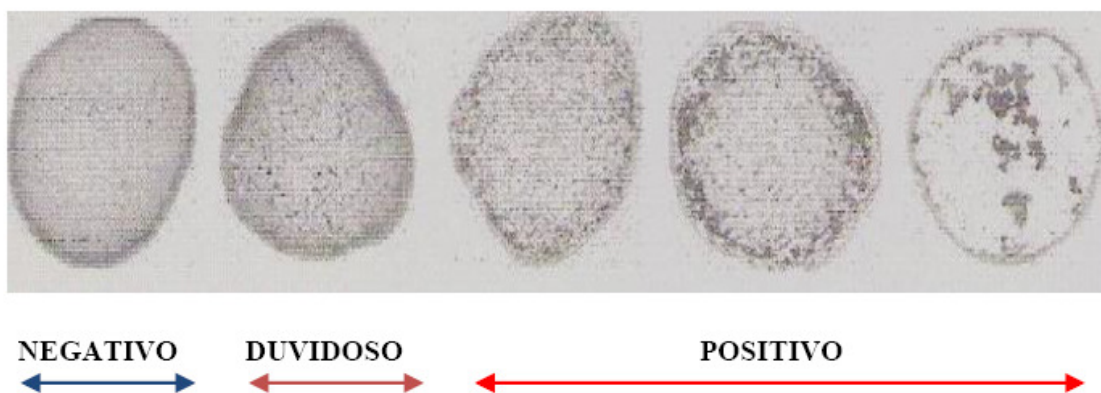
4. Centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 30 minutos
5. Descartar o sobrenadante e resuspender o depósito com 25 ml de azida sódica a 1%
6. Repetir o procedimento 4
7. Repetir o procedimento 5
8. Repetir o procedimento 4
9. Resuspender o depósito em 1 ml de azida sódica a 1%
10. Armazenar em tubos *eppendorfs* de 1,5 ml a 4°C.

**Nota:** Os antigénios preparados e seleccionados foram testados com soros positivos de doentes, confirmados pela TAM e também com PBS (controlo negativo), para se verificar se ocorria, ou não a formação de aglutinação).

## **2ª Etapa: Metodologia da técnica**

1. Diluir 1:10 o soro “problema” com PBS
2. Agitar no vortex o tubo com o antigénio
3. Colocar 15 µl de soro diluído e 15 µl de antigénio numa lâmina de vidro
4. Utilizar a ponta da micropipeta para ajudar a homogeneizar, espalhando em círculos em cerca de 15 mm de diâmetro
5. Agitar manualmente durante 4 minutos
6. Após a agitação, observar a lâmina contra um fundo escuro com o auxílio de uma fonte de luz incidente sobre a lâmina

A leitura realiza-se da seguinte forma:



Interpretação de resultados:

	Soro Total	Soro diluído (1:10)
Positivo	$\geq++$	$\geq++$
Não Conclusivo (NC)	$\geq++$	$<++$
Negativo	$<++$	-

# Anexo 5

## TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (em microplaca)

(Teste de Referência para a Leptospirose, sob critérios da OMS)

(adaptado de Vieira, 2006)

### Objectivo:

- **Diagnóstico serológico de rotina**, através da detecção de anticorpos específicos para *L. interrogans* s.l. em soros “problema” (humanos ou animais)

### Material (reagentes, material biológico e equipamento):

- Microscópio de campo escuro com objectiva de longa distância focal (x20) para leitura directa de microplacas
- Estufa de incubação a 37°C
- Bico de Bunsen
- Vortex
- Solução salina tamponada com fosfatos (Tampão PBS: pH 7,2-7,4)
- Antígenos vivos (leptospiras) - culturas jovens com 4 a 10 dias em meio de EMJH líquido, com uma densidade aproximada de  $10^8$  bact/ml, previamente examinadas em fundo escuro para controlo da respectiva densidade e qualidade
- Micropipetas de 5 a 50µl
- Micropipeta multicanal
- Microplacas de fundo plano
- Tubos *ependorf* de 1,5 mL
- Pipetas de Pasteur calibradas (1 gota  $\pm$  34 µl)

**Procedimentos:**

**Parte A – Fase de rastreio das amostras de soro, em diluições baixas:**

1. Diluir os soros a 1:25 em tampão PBS;
2. Marcar as microplacas com as iniciais dos antigénios, o número atribuído a cada soro problema e a testemunha, conforme o esquema representado:

	Ag. A	Ag. B	Ag. C	Ag. D	Ag. E	Ag. D
Soro 1						
Soro 2						
Soro3						
Soro 4						
...						
T						

Ag. – Antigénio; T – Testemunha

3. Distribuir, com o auxílio de uma micropipeta multicanal, 35 µl de Tampão PBS em todos os poços até à linha da Testemunha (inclusive);
4. Distribuir 35 µl do soro problema diluído nos poços de todos os antigénios correspondendo à diluição 1:50;
5. Adição de uma gota de antigénio utilizando uma pipeta de Pasteur (calibrada e estéril), em todos os poços da coluna dos soros problema a analisar até à linha de Testemunha (inclusive);
6. Bater suavemente nas laterais da microplacas para facilitar a mistura dos reagentes;
7. Tapar a microplaca e incubar na estufa a 37°C, durante 2 horas;
8. Observar as microplacas no microscópio de campo escuro, tendo como referência as testemunhas como controlo negativo.

## Parte B – Titulação dos soros positivos, em diluições seriadas

1. Marcar as microplacas conforme o esquema representado:

	Soro A	Soro B	Soro C	Soro D	Soro E	Soro F
1:50						
1:100						
1:200						
1:400						
1:800						
1:1600						
1:3200						
T						

T – Testemunha

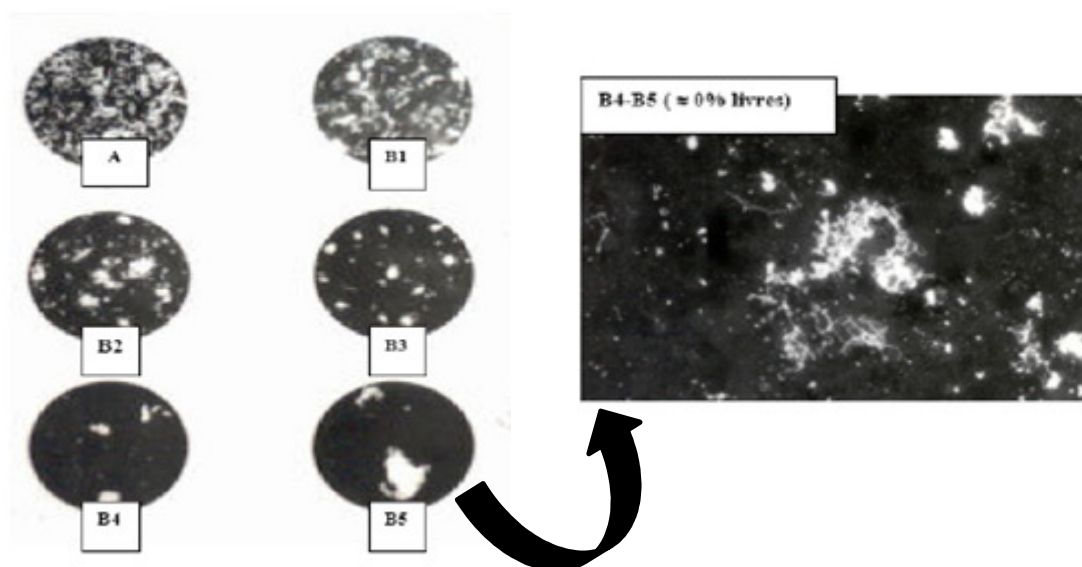
**Nota:** Poderão ser necessárias mais titulações para determinados soros, visto que deve ser atingido o título terminal (diluição sérica na qual estão presentes menos de 50% de leptospiras livres, quando comparado com a cultura de controlo (Testemunha) diluída a 1:2 em tampão PBS).

2. Adicionar 35  $\mu$ l do soro problema diluído nos poços correspondentes à diluição 1:50;
3. Adicionar 35  $\mu$ l do Tampão PBS em todos os poços da diluição 1:50;
4. Recolher 35 $\mu$ l de solução na diluição 1:200 e transferir para a diluição seguinte (1:400) utilizando a pipeta multicanal, repetir o processo de transferência de volume para a diluição seguinte, e continuar o procedimento até à última diluição, na qual o volume (35  $\mu$ l) é descartado;
5. Acrescentar igual volume de antigénio utilizando uma pipeta de Pasteur calibrada em todas as diluições até à testemunha (inclusive);
6. Bater suavemente nas laterais da microplaca para facilitar a mistura dos reagentes;
7. Tapar e incubar a microplaca na estufa a 37°C, durante 2 horas;
8. Observar as microplacas no microscópio de campo escuro, tendo como referência as testemunhas, como controlo negativo

### Leitura das Microplacas:

O título final a considerar numa reacção positiva, é dado quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas, geralmente, a partir da diluição mínima de 1:100. A intensidade da aglutinação por campo de observação e por comparação com o respectivo controlo negativo, está registada abaixo:

Aglutinação	Critério	Resultado
0%	-	Negativo
25-50%	+	Negativo
50-75%	++	Positivo
75%-100%	+++	Positivo
100%	++++	Positivo



**Figura A** – Exemplo da leitura da aglutinação microscópica. A – Testemunha; B1-B5, Intensidade crescente da aglutinação: B1 (75% livres); B2 (50% livres); B3 (25% livres); B4-B5 (≈0% livres) (*adaptado de Collares-Pereira, 1992*)

## Anexo 6

Cálculos realizados na avaliação do “Valor Diagnóstico” do Teste MACROLepto:

Fórmulas de Cálculo utilizadas:

		TAM (Teste de Referência)		
		Positivo	Negativo	
MACROLepto (teste de rastreio)	Positivo	a	b	a – Verdadeiros Positivos b – Falsos Positivos
	Negativo	c	d	c – Falsos Negativos d – Verdadeiros Negativos

		TAM (Teste de Referência)		
		Positivo	Negativo	Total
MACROLepto (teste de rastreio)	Positivo	5 (a)	8 (b)	13
	Negativo	0 (c)	17 (d)	17
	Total	5	25	30

$$\text{Sensibilidade} = a / (a+c) = 5 / (5+0) = 5 / 5 = 1 \rightarrow 100\%$$

$$\text{Especificidade} = d / (b+d) = 17 / (8+17) = 17 / 25 = 0,68 \rightarrow 68\%$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = a / (a+b) = 5 / (5+8) = 5 / 13 = 0,38 \rightarrow 38\%$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = d / (c+d) = 17 / (0+17) = 17 / 17 = 1 \rightarrow 100\%$$

Cálculos realizados para o Teste K:

$$K = (a + d - P) / (1-P)$$

Sendo que  $P = (a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)$

$$P = (5+8)(5+0) + (0+17)(8+17)$$

$$P = (13 \times 5) + (17 \times 25)$$

$$P = 490$$

Logo:

$$K = (5+17 - 490) / (1-490)$$

$$K = (-468) / (-489)$$

$K = 0,957$  (concordância robusta entre os dois testes).

**Nota:** o valor mínimo de concordância do teste K é igual a **0,81**