

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO
PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA**

Teresa Margarida Vaz Pereira Quaresma Carreira

**LISBOA
2009**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Investigadora Auxiliar Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Responsável interina* da Unidade de Ensino e Investigação de Leptospirose e Borreliose de Lyme do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

**em substituição da Directora da Unidade, Investigadora Coordenadora Doutora Margarida Collares Pereira*

AGRADECIMENTOS

Porque nada na vida se consegue sozinho, quero aqui expressar os meus agradecimentos, usando apenas duas palavras:

MUITO OBRIGADA ...

À Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, minha orientadora científica, quero expressar a minha profunda gratidão pela dedicada atenção dispendida ao longo dos meses de trabalho. Pela amizade, pela disponibilidade, pela partilha de conhecimentos, pelo apoio constante ao longo da realização deste trabalho.

À Investigadora Doutora Margarida Collares-Pereira por me ter dado a oportunidade de conhecer o “Mundo das leptospiras” e agradeço igualmente a sábia e brilhante transmissão de conhecimentos científicos.

À Mestre Mónica Nunes, pela companhia, amizade e ajuda prestada. Um “Muito Obrigada especial” pela paciência para inúmeras questões levantadas e pela partilha de todo o conhecimento científico.

À Céu Mateus pela ajuda proporcionada, que é sempre preciosa.

A todos os colegas de trabalho e a todos os que, por lapso, possa ter omitido, o meu Muito Obrigada!

Finalmente, mas sempre em primeiro lugar, à minha família, especialmente aos meus pais por tudo o que sempre fizeram por mim.

Ao meu marido Luís pelo seu amor, carinho, paciência, conselhos e interesse pelo meu trabalho, e aos meus filhos Afonso e Rita pela alegria que me dão todos os dias.

... POR TUDO!!!

RESUMO

Em Portugal, estudos recentes têm evidenciado um aumento da incidência da Leptospirose, particularmente, no Arquipélago dos Açores (11,1 casos/100.000 habitantes), onde representa um problema emergente de Saúde Pública. O diagnóstico laboratorial baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* sensu lato pela Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM). Contudo, a ausência de aglutinas detectáveis nos dois a três primeiros dias da doença, obriga ao recurso a métodos moleculares susceptíveis de um diagnóstico mais precoce.

Com o objectivo de implementar uma técnica de PCR passível de contribuir para o diagnóstico precoce da Leptospirose, analisaram-se 164 soros de doentes com suspeita de infecção por *Leptospira* e uma evolução clínica de um a sete dias. Utilizando quatro protocolos diferentes, como segue: um PCR convencional com os primers G1-G2 (gene *secY* conservado entre leptospiros patogénicas, excepto em *L. kirschneri*), a par de um novo PCR convencional e de um *nested*-PCR com os primers A-lipL21 e U-lipL21 (gene *lipL21*) e A-lipL32 (gene *lipL32*), respectivamente, baseados em genes codificantes de proteínas da membrana externa de leptospiros patogénicas. Todas as amostras foram igualmente testadas pela TAM.

Os resultados dos *nested*-PCR (gene *lipL32*) evidenciaram DNA leptospírico em 127 (77,4%) das 164 amostras analisadas, enquanto que os PCR's com os primers G1-G2 e U-lipL21 detectaram 20 (12,2%) e 11 (6,7%) soros positivos, respectivamente. A TAM mostrou reactividade positiva em 22 (13,4%) dos doentes. A aplicação do *nested*-PCR confirmou um valor diagnóstico muito significativo ($p < 0,001$), na fase inicial da doença, quando comparado com a técnica de referência (TAM).

A presente investigação constituiu, assim, um contributo relevante para o diagnóstico precoce da Leptospirose, cuja evolução clínica se pode traduzir em complicações muito graves e, por vezes, com um desfecho fatal, na ausência de um diagnóstico em tempo útil.

SUMMARY

In Portugal, recent studies have shown an increased incidence of Leptospirosis, particularly, in the Azores Islands (11.1 cases/100 000 population), where it is considered an emergent Public Health problem. The laboratory diagnosis is based on the detection of anti-*Leptospira interrogans* sensu lato antibodies by the reference Microscopic Agglutination Test (MAT). However, the absence of detectable agglutinins in the first two to three days of disease obliges the use of molecular methods aiming at an early diagnosis of Leptospirosis.

In order to implement a PCR technique designed to contribute to the early diagnosis of leptospirosis, 164 patient's sera with a suspicion of *Leptospira* infection and a clinical evolution of one to seven days were examined. Four PCR protocols have been work as follows: a conventional PCR with *primers* G1-G2 (on *secY* gene which is conserved among pathogenic leptospires, except for *L. kirschneri*), and another conventional PCR and *nested*-PCR with *primers* A-lipL21 and U-lipL21 (*lipL21* gene), and A-lipL32 (*lipL32* gene) respectively, based on genes encoding proteins of the outer membrane of pathogenic leptospires. All samples were also tested by MAT.

The *nested*-PCR (*lipL32* gene) identified leptospiral DNA in 127 (77.4%) samples sera, and PCR's with *primers* G1-G2 and U-lipL21 detected 20 (12.2%) and 11 (6.7%) positives, respectively. MAT showed positive sera reactivity in 22 (13.4%) patients. Comparison of *nested*-PCR *versus* MAT results showed a significant difference ($p < 0.001$) for the molecular diagnosis in the early stage of the disease.

This research represents a relevant contribution for the early diagnosis of Leptospirosis, which clinical evolution can lead to very severe complications and sometimes to a fatal outcome, in the absence of a timely diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

anti log – anti-logaritmo

C – Citosina

DGS – Direcção Geral de Saúde

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleótido-trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH – *Ellinghausen, McCullough & Johnson Harris*

G – Guanina

gl – Grau de liberdade estatístico

IgG - Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

IHMT/UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa

IL - Interleucinas

INE – Instituto Nacional de Estatística

INF γ – Interferão-gama

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

K – teste *Kappa*

kDa – KiloDalton

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LipL21 – Lipoproteína Lepto21

LipL32 – Lipoproteína Lepto32

LipL36 – Lipoproteína Lepto36

LipL41 – Lipoproteína Lepto41

LipL46 – Lipoproteína Lepto46

Loa22 – Lipoproteína de *Leptospira* no domínio da OmpA

log – Logaritmo

LPS – Lipopolissacáridos

MACRO – Técnica de Aglutinação Macroscópica

μ g – Micrograma

μl – Microlitro
 μm – Micrometro
 μM - Micromolar
mg - Miligrama
 MgCl_2 – Cloreto de Magnésio
min – Minuto
ml - Mililitro
MLST - *Multilocus Sequence Typing*
mM – Milimolar
mU – Milhão de unidades
 NH_4 – Amónia
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sulfato de Amónia
nM - Nanomolar
OMP's – *Outer Membrane Protein* (Proteína da membrana externa)
OmpA – *Outer membrane protein A*
OmpL1 – *Outer Membrane Leptospira protein 1*
OMS – Organização Mundial de Saúde
 p – Nível de significância
pb – Par de Bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
pH – Potencial hidrogenómico
pM - Picomolar
pmol – Picomoles
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
rRNA – ribosomal *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribossomal)
s.l. – sensu lato
T – Timina
TAE – Tampão Tris, Ácido Acético e EDTA
TAM – Teste de Aglutinação Microscópica
TGM – Título Geométrico Médio
TNF- α – Factor de Necrose Tumoral-alfa
tris-HCl – Tris (hidroximetilo) aminometano – ácido clorídrico
U - Unidades
ULBL – Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme
V – Volts
VNTR - *Variable Number Tandem Repeat*
WHO/ILS – *World Health Organization / International Leptospirosis Society*

χ^2 – Qui-quadrado

% - Percentagem

Σ - Somatório

2D – Duas dimensões

°C – Grau Celsius

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
SUMMARY	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificação do Tema e Objectivos	2
1.2. Revisão da literatura	4
1.2.1. Leptospiras e Leptospirose	4
1.2.1.1. Leptospiras	4
1.2.1.2. Leptospirose	6
1.2.2. Epidemiologia	7
1.2.3. Leptospirose em Portugal	9
1.2.4. Patogénese	10
1.2.4.1. Virulência e hospedeiro	10
1.2.4.2. Proteínas de superfície	12
1.2.5. Aspectos Clínicos	14
1.2.6. Diagnóstico Laboratorial	15
1.2.6.1. Métodos Directos	16
<i>Exame microscópico em campo escuro</i>	16
<i>Isolamento bacteriano - Cultura</i>	17
<i>Amplificação do DNA (PCR)</i>	18
1.2.6.2. Métodos Indirectos	20
<i>Teste de Aglutinação Macroscópica (MACRO)</i>	20
<i>Teste ELISA</i>	20
<i>Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)</i>	21
1.2.7. Tratamento, prevenção e controlo	24
1.2.7.1. Terapêutica	24
1.2.7.2. Prevenção e Controlo	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Amostras e critérios de inclusão	27
2.1.1. População alvo	27
2.1.2. População controlo	28
2.2. Análise Imunológica	28
2.2.1. Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)	28

2.3. Análise Molecular	29
2.3.1. Extracção de DNA	29
2.3.2. Técnicas de PCR e respectivos <i>primers</i>	30
2.3.2.1. PCR com os <i>primers</i> G1-G2	30
2.3.2.2. <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> A-lipL32	31
2.3.2.3. PCR com os <i>primers</i> A-lipL21	32
2.3.2.4. PCR com os <i>primers</i> U-lipL21	33
2.4. Visualização dos produtos amplificados (DNA)	34
2.5. Análise de Dados	35
3. RESULTADOS	36
3.1 População Alvo	37
3.1.1. Caracterização da População	37
3.2. Análise Imunológica	38
3.3. Análise Molecular	40
3.3.1. Sensibilidade e especificidade do PCR	40
3.3.2. PCR com os <i>primers</i> G1-G2, A-lipL32 e U-lipL21	41
3.4. População Controlo	44
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	46
5. BIBLIOGRAFIA	51
6. ANEXOS	59
Anexo 1 – Teste de Aglutinação Microscópica	60

ÍNDICE DE FÍGURAS

	Pág.
Figura 1.1	Microfotografia de <i>Leptospira</i> sp (microscopia electrónica)..... 4
Figura 1.2	Representação esquemática do ciclo de transmissão das leptospiros ao Homem e animais 8
Figura 1.3	Esquema de evolução da Leptospirose humana..... 11
Figura 1.4	Representação esquemática da localização de de algumas fracções antigénicas (LPS e proteínas) existentes nas leptospiros patogénicas; ME – Membrana Externa; EP – Espaço periplasmático; Pep – Peptidoglicano; MI – Membrana Interna; Cito – Citoplasma..... 13
Figura 1.5	Visualização de leptospiros em microscópio de fundo escuro..... 17
Figura 1.6	Tubo de EMJH semi-sólido com crescimento de leptospiros..... 18
Figura 2.1	<i>Primers</i> A-lipL32 utilizados na amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp..... 31
Figura 3.1	Representação da população distribuída pelos diferentes sectores de actividade / profissão, nas duas Regiões..... 38
Figura 3.2	Representação da sensibilidade da técnica de <i>nested</i> -PCR para amplificação de DNA com os <i>primers</i> A-lipL32 (183 pb) de estirpes de <i>L. interrogans</i> s.l.: 1 a 8 – RGA (10^7 a 1 cel/ml); 10 e 11 – Controlos Negativos; 13 – <i>L. biflexa</i> (Patoc); M – Marcador molecular (100pb);..... 40
Figura 3.3 A	Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os <i>primers</i> G1-G2 (285pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Negativo; 19 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb);..... 42
Figura 3.3 B	Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os <i>primers</i> A-lipL32 (183pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Negativo; 19 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb);..... 42

Figura 3.3 C	Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os <i>primers</i> A-lipL32 (183pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Negativo; 19 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb);.....	42
Figura 3.4	Fluxograma de diagnóstico e resultados dos doentes avaliados. TAM – Teste de Aglutinação Microscópica; PCR – Reacção em cadeia da polimerase; POS – Positivo; NEG – Negativo; NC – Não Conclusivo.....	43
Figura 3.5 (A,B)	Resultados do <i>nested</i> -PCR A-lipL32 (A) e resultados da TAM (B) <i>versus</i> dias de evolução da doença.....	44
Figura A.1	Exemplo de uma aglutinação microscópica. A, Testemunha. B1-B5, intensidade crescente da aglutinação: B1 (75% livres), B2 (50% livres), B3 (25% livres), B4-B5 (≈ 0% livres)	64

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

	Pág
Tabela 1.1 Testes de diagnóstico laboratorial para a Leptospirose de acordo com a fase de evolução e produto biológico a analisar.....	16
Tabela 1.2 Bateria de antígenos de referência de serovares de <i>Leptospira</i> spp. a incluir no diagnóstico imunológico da Leptospirose humana pela TAM nos laboratórios de referência	22
Quadro 2.1 Distribuição dos soros por Região e género.....	30
Tabela 2.1 <i>Primers</i> G1-G2 utilizados na amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp.....	30
Tabela 2.2 Condições óptimas de PCR com os <i>primers</i> G1-G2.....	31
Tabela 2.3 Condições óptimas (da 1ª e 2ª amplificação) com os <i>primers</i> A-lipL32.....	32
Tabela 2.4 <i>Primers</i> A-lipL21 utilizados na amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp.....	32
Tabela 2.5 Condições óptimas de PCR com os <i>primers</i> A-lipL21.....	33
Tabela 2.6 <i>Primers</i> U-lipL21 utilizados na amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp....	33
Tabela 2.7 Condições óptimas de PCR com os <i>primers</i> U-lipL21.....	34
Tabela 3.1 Resultados da distribuição dos 164 doentes por Região, Género e grandes Grupos etários	37
Tabela 3.2 Resultados do Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) nas amostras analisadas (N=164), de acordo com os critérios de inclusão adoptados.....	38
Tabela 3.3 Resultados do Título Geométrico Médio (TGM) obtidos nos soros positivos e não conclusivos (NC) pela TAM, por região de proveniência	39
Tabela 3.4 Avaliação imunológica pela TAM das 2ªs amostras séricas.....	39
Quadro 3.1 Valores de sensibilidade das Técnicas de PCR para os diferentes protocolos, de acordo os <i>primers</i> utilizados.....	40
Tabela 3.5 Resultados da amplificação do DNA leptospírico com os <i>primers</i> G1-G2, A-lipL32 e U-lipL21 para as amostra estudadas.....	41

Tabela 3.6	Resultado da pesquisa de DNA de <i>Leptospira</i> e de anticorpos específicos na população controlo (<i>Grupo 1</i> - dadores de sangue) e (<i>Grupo 2</i> - doentes de Borreliose de Lyme, Sífilis e Malária).....	45
Tabela A.1	Bateria de antigénios de <i>L. interrogans</i> s.l. e de <i>L. biflexa</i> s.l. utilizada no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) na ULBL.....	63

Parte dos resultados incluídos nesta Dissertação deram origem a uma comunicação a apresentar no Congresso “MicroBiotec’09”, Vilamoura (28 a 30 de Novembro de 2009).

“Early detection of bacterial DNA based on *secY*, *lipL21* and *lipL32* genes in human leptospirosis”

Teresa Carreira, Mónica Nunes, Maria Luísa Vieira, Margarida Collares-Pereira

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificação do Tema e Objectivos

A Leptospirose é causada por bactérias do género *Leptospira* (família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales), sendo considerada uma doença infecciosa emergente com acentuado polimorfismo clínico que obriga ao recurso de exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico. Em Portugal, estudos recentes (Vieira *et al.*, 2006; Collares-Pereira *et al.*, 2007, 2008) têm demonstrado um aumento da incidência desta patologia, particularmente, no Arquipélago dos Açores, onde as taxas anuais de seropositividade confirmam que esta zoonose é um problema de saúde pública.

A técnica *gold standard* para o imunodiagnóstico da Leptospirose é o Teste de Aglutinação Microscópica (TAM). No entanto, este teste apresenta limitações principalmente nos primeiros dias da doença (fase leptospirémica), dada a ausência de aglutininas específicas detectáveis. Outros métodos clássicos, tais como a cultura e a microscopia, não são úteis na detecção de *Leptospira sp.* na fase precoce, pela morosidade e natureza da amostra, respectivamente. Deste modo, torna-se cada vez mais imperativo o recurso a abordagens moleculares, como metodologia susceptível de antecipar o diagnóstico de infecção por *Leptospira*, em particular, em situações não diagnosticadas, devido à ausência de uma resposta humoral mensurável, que podem dar azo a complicações graves e, por vezes, com um desfecho fatal.

Assim, tem-se testemunhado nos últimos anos o desenvolvimento de diversos protocolos, para o diagnóstico da Leptospirose, com base na tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). No entanto, continuam a verificar-se (até à data) algumas limitações, como exemplificado no PCR descrito por Gravekamp e colaboradores em 1993, que tem como base o gene *secY*. Com efeito, apesar de conservado entre as leptospiros patogénicas, o referido gene não se expressa de forma análoga em todas as espécies genómicas de *Leptospira*, limitando, por isso, a respectiva utilização.

Estudos prévios realizados na Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme (ULBL) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, no âmbito da caracterização imunológica da resposta humoral, a partir de soros de doentes provenientes do Continente e Açores (ilhas de São Miguel e Terceira), e

com confirmação laboratorial de Leptospirose, demonstraram a presença de fracções antigénicas *major*, particularmente de 21 e de 32 kDa, correspondentes a proteínas da membrana externa de *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.), designadas respectivamente, por LipL21 e LipL32, presentes em todas as leptospiros patogénicas. Perante estas evidências, admitiu-se que seria útil desenvolver abordagens moleculares na perspectiva de um diagnóstico precoce, utilizando sequências iniciadoras (*primers*) baseadas nos genes que codificam as referidas lipoproteínas.

O **principal objectivo** deste trabalho foi, assim, o de contribuir para o diagnóstico laboratorial precoce da Leptospirose através de uma abordagem molecular, com base nos seguintes **objectivos específicos**:

- i)* Pesquisar anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l., em doentes com suspeita de Leptospirose, cujas amostras séricas foram obtidas nos primeiros dias após o início dos sintomas (fase aguda), bem como nas amostras seguintes, se disponíveis;
- ii)* Pesquisar DNA leptospírico nas primeiras amostras dos referidos doentes, utilizando *primers* com base nos genes *secY*, *lipL21* e *lipL32*, conservados entre as leptospiros patogénicas.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. Leptospiras e Leptospirose

1.2.1.1. Leptospiras

As leptospiras são espiroquetas que apresentam morfologia típica, com 6 a 20 μm de comprimento, diâmetro de 0,1 μm , espiras curtas e regulares e com as extremidades encurvadas, em forma de gancho (Fig.1.1). De acordo com a classificação convencional, o género *Leptospira* compreende duas espécies, *L. interrogans* s.l. (patogénica) a *L. biflexa* s.l. (saprófita). Ambas pertencem à família Leptospiraceae, da ordem Spirochaetales (Faine *et al.*, 1999).

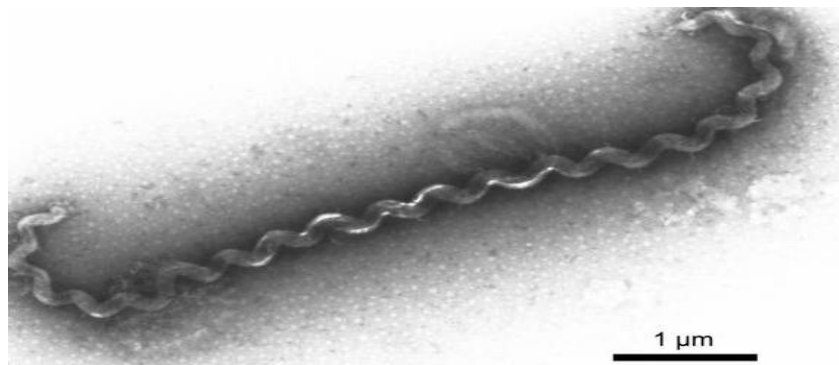


Figura 1.1. Microfotografia de *Leptospira* sp (microscopia electrónica)

(adaptado do site <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>)

As leptospiras exibem movimentos rápidos de rotação e de *spin*, sobretudo nas extremidades encurvadas, mantendo-se a parte central mais ou menos fixa, o que origina uma forma em “8”, muito característica (Berg *et al.*, 1978). A sua mobilidade tem origem em dois flagelos periplasmáticos com inserções polares, localizados no espaço entre a membrana citoplasmática e a bainha da membrana externa.

As leptospiras apresentam uma membrana dupla, comum a outras espiroquetas. A membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicano estão fortemente associadas e revestidas pela membrana externa (Cullen *et al.*, 2004). Esta é constituída por proteínas, lípidos e lipopolissacáridos (LPS), tendo estes últimos, uma elevada importância antigénica, com uma composição semelhante à de outras bactérias Gram-negativas, embora de menor actividade endotóxica nas leptospiras (Faine *et al.*, 1999).

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias com crescimento óptimo entre os 28°C e 30°C, de preferência, com agitação orbital, e um pH entre 6,7 e 7,4. No entanto, quando invadem o organismo dos hospedeiros, incluindo o Homem, estas bactérias têm a capacidade de se adaptarem a temperaturas mais elevadas (Faine *et al.*, 1999). No que se refere às necessidades metabólicas, as leptospiros crescem em meio enriquecido com vitaminas B2 e B12 que estimulam o crescimento, e ainda com sais de amónio e ácidos gordos de cadeia longa que funcionam como fonte de carbono (Faine *et al.*, 1999).

Os meios de cultura podem ser sintéticos, livres de proteínas ou conter soro de coelho ou albumina (Turner, 1970). Algumas formulações de meios líquidos contendo soro de coelho têm sido descritos ao longo do tempo; destes destacam-se, o meio de Fletcher (1928), o meio de Korthof (1932) e o meio de Stuart (1946). No entanto, é o meio de Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris, e designado por EMJH, que inclui albumina, ácido oleico e Tween 80, o mais usado na rotina laboratorial (Ellinghausen & McCullough, 1965; Johnson & Harris, 1967).

Algumas estirpes de crescimento mais difícil requerem a adição de piruvato e/ou soro de coelho para o seu isolamento. O crescimento simultâneo de microrganismos contaminantes, cuja presença é frequente em isolados de amostras clínicas, pode ser inibido pela adição de antibióticos ao meio de cultura, tais como o 5-fluorouracil, a gentamicina, o ácido nalidíxico e a rifampicina (Faine *et al.*, 1999).

O crescimento das leptospiros *in vitro* é geralmente lento nos isolados recentes. As culturas puras podem ser mantidas por repetidas passagens consecutivas – subculturas – em meio líquido, durante 7 a 10 dias cada, período ao fim do qual se atinge, em regra, uma densidade óptima (10^8 células/ml). Nos meio semi-sólidos por adição de uma baixa concentração de agar (0,1 – 0,2 %) ao meio líquido, o crescimento alcança a densidade máxima numa zona ligeiramente abaixo da superfície do meio de cultura, a qual se torna progressivamente mais turva à medida que a incubação se desenvolve. Este crescimento está relacionado com a tensão óptima de oxigénio, sendo a zona de crescimento conhecida como anel ou disco de Dinger (*vide* 1.2.6.1; Fig. 1.6).

O armazenamento destas culturas é preferencialmente realizado em meio semi-sólido. A conservação pode passar por congelação a (-80°C), crio-preservação em azoto líquido e/ou liofilização (Adler *et al.*, 2009).

1.2.1.2. Leptospirose

A Leptospirose é uma antropozoonose de ampla distribuição geográfica, que ocorre no mundo inteiro, excepto na Antártida (Sanford, 1990). É uma patologia endémica em algumas regiões onde o ciclo silvático encontra condições propícias para manter as leptospiras patogénicas em circulação na natureza. O espectro clínico da doença é muito amplo e pode evoluir de uma infecção subclínica a uma síndrome grave, com envolvimento de diversos órgãos e sistemas, a qual tem, em regra, um desfecho fatal se não for tratada em tempo útil (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Passaram pouco mais de 100 anos desde que Adolf Weil, Professor de Medicina em Heidelberg (1886), descreveu a Leptospirose icterica com insuficiência renal causada por *L. interrogans*, serovar Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni (Edward *et al.*, 1990; Sambasiva *et al.*, 2003).

Em 1907, Stimson demonstrou pela primeira vez nos túbulos renais de um doente, a presença de aglomerados de organismos espiralados com as extremidades em forma de gancho semelhantes a um ponto de interrogação, razão pela qual sugeriu que aquele “novo” achado se chamasse “*Spirochaeta interrogans*” (Faine *et al.*, 1999). Porém, esta descrição de Stimson acabaria por ser um erro que hoje não passa de uma curiosidade na História da Medicina, já que a causa da morte do doente foi atribuída à febre-amarela e não à doença de Weil (=Leptospirose). Stimson criou assim, com este “equivoco”, as bases da nomenclatura do agente etiológico da referida doença de Weil (Vieira, 2006).

No entanto, a etiologia da Leptospirose, só foi demonstrada em 1915, quando uma equipa de médicos japoneses, Inada e Ido, isolou a espiroqueta a partir de um cobaio infectado com sangue de um doente sofrendo de doença de Weil, após o que o agente causal passou a ser designado por *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica* (Kobayashi, 2001; Dutta *et al.*, 2005).

Na mesma época, na Europa (Alemanha), a etiologia da Leptospirose era igualmente confirmada. Duas equipas de médicos germânicos analisaram amostras de sangue de soldados alemães sofrendo da então designada “doença francesa das trincheiras” do nordeste de França. Foram inoculados cobaios com o sangue daqueles soldados, tendo sido detectadas espiroquetas que foram designadas como *Spirochaeta nodosa* e *Spirochaeta icterogenes*. Estes nomes viriam a ser sinónimos

de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Vieira, 2006).

Em 1917, foi reconhecido o papel dos roedores como principal fonte de infecção para o Homem, sendo que, desde então, a presença destes animais, especialmente da ratazana comum (*Rattus norvegicus*) passou a ser relacionada com a(s) actividade(s) humana(s) (Levett, 2001). Deste modo, a infecção humana resulta, em regra, da exposição accidental, directa ou indirecta (e.g., através da água, solo e vegetação contaminados), à urina de animais reservatórios, em particular, de roedores. Nos últimos anos, a Leptospirose tem sido descrita como a zoonose mais comum que afecta, além do Homem, também os animais domésticos (ex. cães) ou os de produção pecuária como, bovinos, equinos, suínos, caprinos e equinos. No Homem, esta doença é responsável por um amplo espectro de manifestações clínicas, como febre, mialgias, cefaleias, insuficiência renal aguda, e insuficiência hepática e/ou pulmonar; nos animais, em particular nos bovinos, é responsável por problemas reprodutivos (abortos) e perdas de lactação, entre outras manifestações com impacte económico na produção animal (Adler *et al.*, 2009).

1.2.2. Epidemiologia

Como referido, a distribuição geográfica da Leptospirose é cosmopolita. Contudo, a sua ocorrência é favorecida pelas condições ambientais das regiões de clima tropical e subtropical, onde a elevada temperatura e os altos índices pluviométricos em determinado período do ano, dão origem a cheias que favorecem o aparecimento de surtos epidémicos. No que respeita à epidemiologia da doença, muito cedo foi dada importância à variável ocupação/profissão do indivíduo como factor de risco para contrair a doença. Com efeito, existem algumas profissões que, pelo seu grau de exposição a ambientes contaminados por leptospiras, são consideradas de risco elevado para a ocorrência de infecção por estes agentes, como é o caso dos trabalhadores de saneamento básico (esgotos) e da construção civil, dos agricultores e dos profissionais ligados à pecuária.

No entanto, para o conhecimento efectivo da epidemiologia da Leptospirose, em qualquer região, é indispensável identificar os serovares mais prevalentes na mesma, bem como os respectivos reservatórios/hospedeiros (Levett, 2001).

As leptospiras podem ser transmitidas por alguns dos mamíferos, em particular,

pelos roedores como já referido, contribuindo para isso, o carácter alcalino da urina destes últimos, visto constituir um meio favorável à manutenção prolongada das espiroquetas *in vivo*. Desta forma, os roedores são considerados os reservatórios naturais “de eleição” das leptospirosas, e identificam-se pelas seguintes características: *i)* grande receptividade à infecção; *ii)* reduzida patogenicidade do microrganismo no hospedeiro; *iii)* presença de infecção renal com leptospirúria prolongada; *iv)* infecção crónica; e *v)* transmissão eficaz do agente infeccioso aos animais da mesma espécie por contacto directo. Geralmente a infecção é adquirida numa idade precoce do animal e a frequência da excreção crónica das leptospirosas na urina aumenta com a idade (Ellis, 1983; Timoney *et al.*, 1988; Vieira, 2006).

Por seu lado, o Homem é quase sempre hospedeiro acidental e raramente transmite os agentes causais da doença entre si ou a outras espécies, confirmando-se, assim que o contacto humano acidental, com o meio exterior contaminado pela urina de animais portadores de leptospirosas (hospedeiros crónicos ou reservatórios), constitui a principal fonte de contágio pelos referidos agentes (Faine *et al.*, 1999).

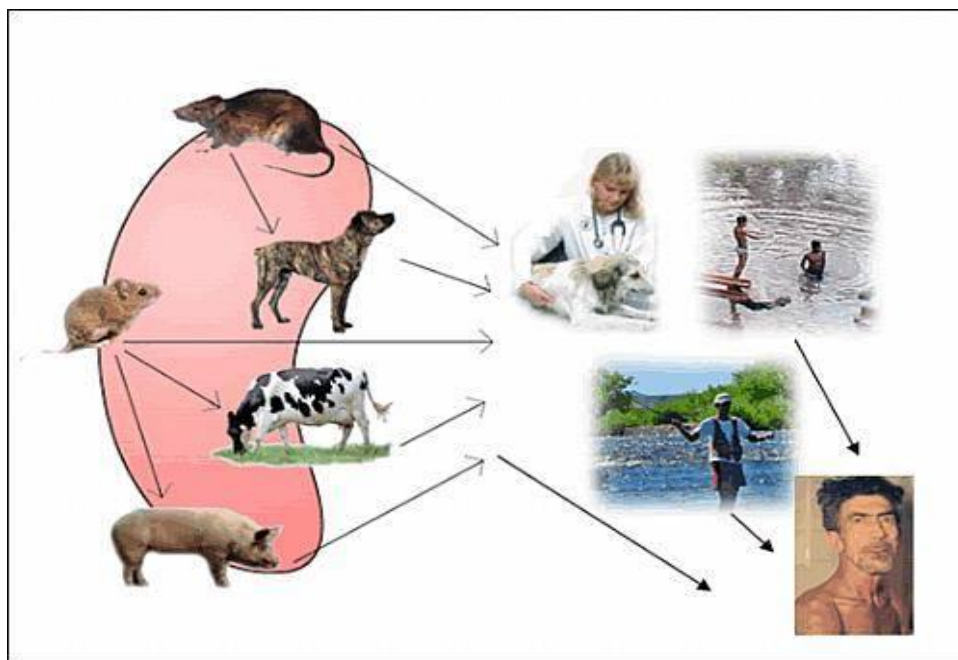


Figura 1.2. Representação esquemática do ciclo de transmissão das leptospirosas ao Homem e animais.

A Leptospirose é uma doença relacionada com os períodos chuvosos, pois quando há elevação dos índices pluviométricos, há um aumento consequente do número de

casos da doença, que podem ocorrer tanto em meio rural como urbano. Em área rural a doença adquire um carácter mais severo, como resultado da maior aglomeração de habitações precárias localizadas junto de cursos de água e/ou de locais sem saneamento básico, ou onde as condições de higiene e de habitação são precárias, e onde os roedores encontram água, abrigo e alimento necessário à respectiva proliferação.

1.2.3. Leptospirose em Portugal

A detecção do primeiro caso de Leptospirose humana em Portugal ocorreu em 1931 e ficou a dever-se a Luís Figueira. No entanto, a investigação mais sistematizada da Leptospirose humana, que foi reconhecida como uma doença de declaração obrigatória para *L. icterohaemorrhagiae* a partir de 1950 e para todas as estirpes infectantes a partir de 1987, apenas aconteceu no início dos anos 80, com os trabalhos desenvolvidos por Collares-Pereira e colaboradores no âmbito da Leptospirose humana e animal, em particular nos domínios da ecologia e da microbiologia (Collares-Pereira *et al.*, 2001; Vieira, 2006).

Em Portugal, cabe actualmente ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL) através da ULBL, enquanto Laboratórios de Referência para a Leptospirose, contribuir para o rastreio e diagnóstico laboratorial da doença, bem como para a apresentação de estratégias e medidas de intervenção, no contexto mais amplo da Saúde Pública.

Com base nos registos oficiais da Direcção Geral de Saúde (DGS) e do Instituto Nacional de Estatística (INE), verifica-se que o número de notificações da Leptospirose tem mostrado uma incidência relativamente baixa no Continente, quando comparado com o número crescente de casos humanos nos Açores (São Miguel e Terceira), onde se tem verificado também a ocorrência de casos fatais nos últimos anos (Vieira *et al.*, 2006).

A investigação iniciada nas últimas duas décadas, do século XX, no Continente e no Arquipélago dos Açores e desenvolvida até ao presente, permitiu confirmar, e reconhecer pela primeira vez no caso das Ilhas, o papel fundamental dos roedores e insectívoros como reservatórios de leptospirosas patogénicas, face à ocorrência

generalizada de infecção por *L. interrogans* s.l. como demonstrado pela obtenção de isolados por cultura do rim dos animais necropsiados (Collares-Pereira *et al.*, 1997, 2000a, 2000b; Vieira, 2006).

No entanto, o verdadeiro conhecimento da prevalência da Leptospirose humana no País parece estar longe de corresponder à realidade, uma vez que continua a ser uma doença de reduzida notificação (Falcão *et al.*, 1999), ou mesmo de diagnóstico inexistente. Este facto é confirmado pelo número de casos (n=642) notificados pela DGS, de 1986 a 2003, comparativamente ao número de casos com confirmação laboratorial (n=822) registados pela ULBL/IHMT na região Centro e Açores (São Miguel e Terceira), durante o mesmo período (Vieira *et al.*, 2006). Admite-se que esta discrepância se deva, por um lado, ao polimorfismo do quadro clínico e, por outro, às dificuldades logísticas envolvidas no diagnóstico imunológico de referência (Vieira *et al.*, 2006).

Estes dados permitiram ainda conhecer as taxas de incidência para o Continente e Açores (São Miguel e Terceira), cujos valores foram de 1,7 casos e 11,1 casos/100.000 habitantes, respectivamente. Foi demonstrado que esta patologia é um problema crescente de Saúde Pública em Portugal, e que são necessários uma boa monitorização e notificação correctas, além do respectivo suporte laboratorial, para a redução do impacte da doença em áreas de risco (Vieira *et al.*, 2006).

1.2.4. Patogénese

1.2.4.1. Virulência e hospedeiro

Em regra, as leptospirosas penetram no organismo humano, através da pele lesionada e das mucosas intactas, principalmente as conjuntivas. Na primeira fase da doença, “fase de septicémica” ou “leptospirémica”, as bactérias encontram-se apenas na corrente sanguínea, e aí permanecem por cerca de sete dias. Logo que o número de leptospirosas no organismo (sangue e outros órgãos) atinge um nível crítico, surgem os primeiros sinais e sintomas inespecíficos, com principal relevância para a febre, cefaleias e mialgias, as quais podem ser muito intensas.

Quando começam a aparecer os anticorpos anti-*Leptospira* em circulação, inicia-se a segunda fase, a “fase imune”. As leptospirosas começam então a ser eliminadas da

circulação hematogénea e dos tecidos “alvo”, através do fenómeno de opsonização. As lesões orgânicas, mesmo que sejam graves, são geralmente reversíveis, podendo no entanto, deixar marcas (Adler *et al.*, 2009).

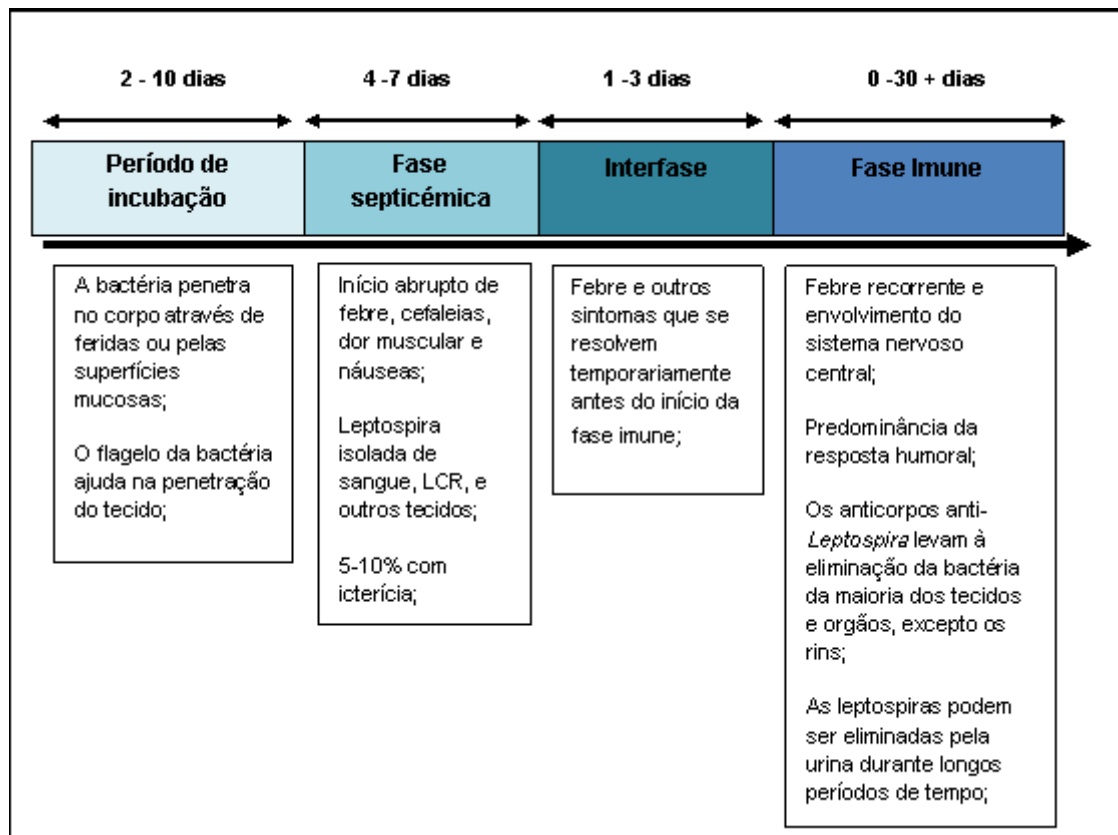


Figura 1.3. Esquema da evolução clínica da Leptospirose humana.

[Acedido em: http://www.searo.who.int/LinkFiles/CDS_leptospirosis-Fact_Sheet (adaptado)]

Porém, quando a primeira resposta imunológica não é suficiente para deter o progresso das leptospirosas, estas avançam nos tecidos e aí multiplicam-se rapidamente (Faine, 1964; Acosta *et al.*, 1994), prolongando o período de incubação que pode chegar a 30 dias, e voltam a surgir os sinais e sintomas iniciais. Assim, as complicações da Leptospirose surgem geralmente na segunda semana da doença, devido à localização das leptospirosas nos tecidos (Vieira *et al.*, 2006).

Os mecanismos que originam as lesões tecidulares e a doença, no Homem e/ou nos animais, causadas por estas bactérias, ainda não são bem conhecidos, em particular no que se refere à base molecular da respectiva virulência (Adler *et al.*, 2009).

A variabilidade das manifestações depende de alguns factores, nomeadamente, da virulência intrínseca dos diferentes serovares, da densidade do inóculo, da resposta imune do hospedeiro, e da evolução clínica da doença, que pode ser de maior ou

menor gravidade.

O primeiro factor de virulência nas leptospirosas patogénicas foi identificado por Ristow e colaboradores (2007), e corresponde à lipoproteína de superfície “Loa22”. A função desta proteína permanece desconhecida, mas sabe-se que esta ou uma homóloga não se encontra na espécie saprófita *L. biflexa* s.l. (Adler *et al.*, 2009).

No que respeita à resposta do hospedeiro, estão envolvidas a imunidade humoral com produção de anticorpos anti-LPS e anticorpos contra diversas proteínas, e a imunidade celular, com produção de diversas interleucinas (IL), do factor de necrose tumoral (TNF- α) e do interferão gama (INF γ), entre outros (Dorigatti *et al.*, 2005).

Os mecanismos patogénicos da Leptospirose resultam assim, quer do efeito directo da bactéria sobre os tecidos, quer da resposta imune do hospedeiro à infecção. A lesão patogénica mais comum desta doença é a vasculite, com o envolvimento multi-sistémico do organismo, sendo os órgãos alvo os rins (preferencialmente), o fígado, os pulmões e o coração (Levett, 2001).

1.2.4.2. Proteínas de superfície

Estudos recentes demonstraram que as proteínas de superfície são vitais para a infecção por *Leptospira* spp. Como descrito anteriormente, estas bactérias apresentam uma dupla membrana, estando a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicano fortemente associadas e revestidas por uma membrana externa que contém LPS e várias lipoproteínas, as proteínas de membrana externa (OMP's, *Outer Membrane Protein*). Os LPS são muito imunogénicos e são responsáveis pela especificidade do serovar. De acordo com os resultados de vários estudos genómicos, sabe-se que existem mais de 260 proteínas de membrana (Haake, 2000; Levett, 2001; McBride *et al.*, 2005).

Através de técnicas específicas, tais como electroforese 2D e espectrofotometria de massa, foram identificadas proteínas de superfície algumas das quais estão representadas na Figura 1.4.

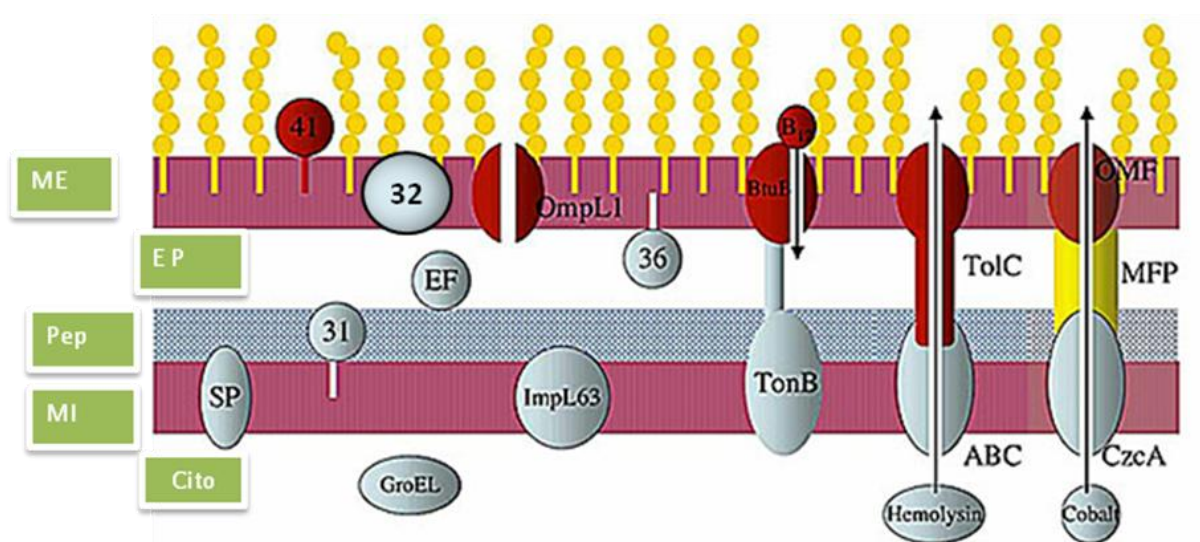


Figura 1.4 Representação esquemática da localização de algumas frações antigênicas (LPS e proteínas) existentes nas leptospiros patogênicas; ME – Membrana Externa; EP – Espaço perioplasmático; Pep – Peptidoglicano; MI – Membrana Interna; Cito – Citoplasma.

[Acedido em: <http://www.scielo.br/img/revistas/bjmr/v37n4/html/5500i06.htm> (adaptado)]

As OMP's presentes nas leptospiros foram divididas em três classes (Cullen *et al.*, 2003), a maior das quais é composta pelas lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL48 e LipL41. A LipL32 é uma proteína de cerca de 32kDa e é a mais abundante nas leptospiros patogênicas, não existindo nas saprófitas. É igualmente a proteína mais reconhecida no soro de pacientes infectados com *Leptospira* (Haake *et al.*, 2000; Vieira, 2006). As proteínas LipL41 e LipL32 são expressas tanto *in vivo* como *in vitro*, e também só são detectadas em serovares patogênicos (Cullen *et al.*, 2003). Outra proteína, LipL36, está ancorada à face interna da membrana externa e só é expressa *in vitro*, não tendo aplicação em testes de diagnóstico (Haake *et al.*, 2000).

A segunda e terceira classes de proteínas são compostas apenas por um representante de cada uma. A OmpL1, pertencente à segunda classe, é uma proteína transmembranar e admite-se que se trata de uma porina (Cullen *et al.*, 2003). A P31_{LipL45}, relativa à terceira classe, é uma proteína periférica da membrana que, através dos canais de secreção das lipoproteínas, alcança as membranas interna e externa da bactéria (Cullen *et al.*, 2003).

No Homem a imunidade à Leptospirose é assim mediada primariamente por anticorpos anti- LPS. Esta imunidade é específica do serovar e tem conduzido a uma pesquisa das proteínas de superfície conservadas que mais estão envolvidas na imunidade humoral.

Uma das proteínas mais importantes, como já referido, é a LipL32, cujo componente proteico permanece externo à membrana, e ancorado a esta através de ácidos gordos que se ligam de forma covalente ao grupo amino terminal da cisteína residual. Existem várias evidências que sugerem a importância desta lipoproteína na patogénese da doença.

O gene *lipL32* codificante da referida lipoproteína está presente apenas nas espécies patogénicas de *Leptospira*, apresentando um elevado grau de conservação. Dada a importância de que este gene e a respectiva proteína se revestem, quer nos mecanismos de patogénese quer de imunidade, tem sido alvo de inúmeros estudos, alguns dos quais contraditórios. Com efeito, ensaios realizados em culturas de células renais indicam que a LipL32 induz uma resposta inflamatória. Por outro lado, estudos *in vivo* demonstraram também que esta lipoproteína é o alvo principal da resposta imune humoral em animais e no Homem, expressando-se nos rins destes. Outros estudos em modelos animais demonstraram ainda, que a LipL32 confere uma protecção parcial contra a Leptospirose. No entanto, estudos recentes (Vivian *et al.*, 2009) apontam para o facto de anticorpos anti-LipL32, produzidos como resposta imune numa infecção natural, não induzirem qualquer protecção.

No que respeita à lipoproteína LipL21, esta é a segunda proteína de superfície mais abundante, em *L. interrogans*, serovar Lai. Esta lipoproteína apresenta também uma sequência muito conservada nas leptospiros patogénicas, não sendo detectada em espécies saprófitas. A LipL21 está exposta à superfície da membrana e é igualmente imunogénica, sendo reconhecida por soros imunes humanos e de hamsters infectados por *Leptospira* spp.

Alguns estudos revelaram que a LipL21 é um novo membro da pequena família das OMP's conservadas e únicas nas espécies patogénicas (Cullen *et al.*, 2003). Mais recentemente, outros estudos têm mencionado a importância desta lipoproteína como alvo para a produção de vacinas (He *et al.*, 2008).

1.2.5. Aspectos Clínicos

A Leptospirose humana apresenta, como já referido, um espectro amplo de manifestações clínicas que variam desde as formas **anictéricas**, mais benignas, em 80 a 90% dos casos, a formas **ictéricas**, mais graves em 5 a 10% dos casos. Os

doentes com Leptospirose **anictérica** apresentam uma diversidade elevada de sinais e sintomas, tais como: febre, cefaleias, mialgias, dores abdominais, anorexia, conjuntivite e, por vezes, erupção cutânea (exantema).

A Leptospirose **ictérica**, também denominada de síndrome de Weil, é a forma mais grave da doença e apresenta normalmente as seguintes manifestações: icterícia, insuficiência renal aguda, hemorragia pulmonar, podendo incluir também miocardite e choque (Bharti *et al.*, 2003; Segura *et al.*, 2005; Spichler *et al.*, 2005). A doença de Weil pode ter duas formas de evolução: doença de curso prolongado, ou monofásica aguda progressiva, nos casos com desfecho fatal.

As taxas de mortalidade associadas à síndrome de Weil são da ordem dos 5 a 15 %, de acordo com a literatura (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Ricaldi e Vinetz, 2006).

1.2.6. Diagnóstico Laboratorial

Devido ao facto da Leptospirose apresentar um quadro clínico inicial inespecífico com uma grande diversidade de sintomas (Levett, 2001), os exames laboratoriais têm grande importância no diagnóstico desta doença. A selecção dos mesmos está dependente da fase da doença (*vide* 1.2.4.1.).

O diagnóstico de doenças infecciosas tem como pré-requisito a disponibilidade de testes adequados (Palaniappan *et al.*, 2007). No que respeita à Leptospirose, o diagnóstico laboratorial baseia-se em métodos directos (cultura e técnicas de biologia molecular) e em métodos indirectos (detecção de anticorpos específicos). A escolha do método e do material biológico a analisar é assim dependente do tempo de evolução após os primeiros sintomas, dado os muitos acontecimentos patogénicos envolvidos no decurso da infecção leptospírica (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Testes de diagnóstico laboratorial para a Leptospirose, de acordo com a fase de evolução e produto biológico a analisar [(adaptado de Bolin C. e Pfizer Animal Health, (sem data); Vieira, 2006)]

MÉTODOS	DIAS DE EVOLUÇÃO	PRODUTO BIOLÓGICO	TESTE
DIRECTOS	≤ 10 dias	Sangue, LCR	Microscopia em Campo Escuro
		Sangue, LCR	Isolamento Bacteriano (EMJH)
		Sangue, Urina, LCR	PCR
	>10 dias	Urina	Microscopia em Campo Escuro
		Urina	Isolamento Bacteriano (EMJH)
INDIRECTOS	(Rastreio) ≥5 dias	Soro, LCR	Teste de Aglutinação Macroscópica (antigénio inactivado)
	(Confirmação) >6 dias	Soro, LCR	Teste de Aglutinação Microscópica (antigénios vivos) <i>Téc. Referência</i>
		Soro, LCR	ELISA (detecção de anticorpos IgM)

1.2.6.1. Métodos Directos

Exame microscópico em campo escuro

A visualização das leptospiras em microscopia de campo escuro é uma técnica com sensibilidade e especificidade baixas, requerendo microorganismos intactos e preferencialmente viáveis (Adler *et al.*, 1982; Champagne, 1991; Levett *et al.*, 2001). Devido à existência de vários componentes celulares semelhantes às referidas espiroquetas, é necessário um cuidado particular na confirmação destes microrganismos por este método (Turner, 1970), sendo necessária uma concentração aproximada de 10^4 leptospiras/ml para conseguir observar-se uma destas bactérias ao microscópio (Levett *et al.*, 2001).

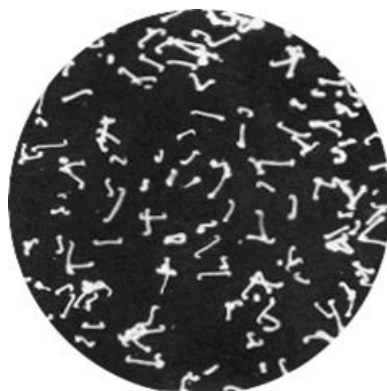


Figura 1.5. Visualização de leptospiras em microscópio de fundo escuro
[fotografia do autor ; x200]

Isolamento bacteriano - Cultura

A detecção de leptospiras por cultura é um diagnóstico concludente. No entanto, os procedimentos de isolamento são trabalhosos, morosos e requerem amostras frescas com uma concentração significativa de leptospiras. Deste modo, não se aplica como um diagnóstico de rotina, mas é importante para fins epidemiológicos (Adler *et al.*, 2009). As hemoculturas devem ser efectuadas em meios selectivos semi-sólidos como o EMJH (*vide* 1.1 Leptospiras), após o que são incubadas entre os 28°C e 30°C, examinadas semanalmente em microscópio de fundo escuro e mantidas durante um período nunca inferior a 13 semanas, depois do que, se não se observar crescimento leptospírico, as culturas serão descartadas (Levett, 2001).

O isolamento de leptospiras a partir de material contaminado (fluidos orgânicos ou tecidos) pode ser obtido por sementeira directa em meio de cultura selectivo ou por inoculação em animais de laboratório, como o hamster e o cobaio (Wolf, 1954; WHO/ILS, 2003). Em regra, o sucesso desta abordagem depende de dois factores distintos: por um lado, a densidade *versus* volume do inóculo do material a cultivar e, por outro, a ocorrência de possíveis contaminantes que importa eliminar, dado o crescimento fastidioso das leptospiras (Vieira, 2006).

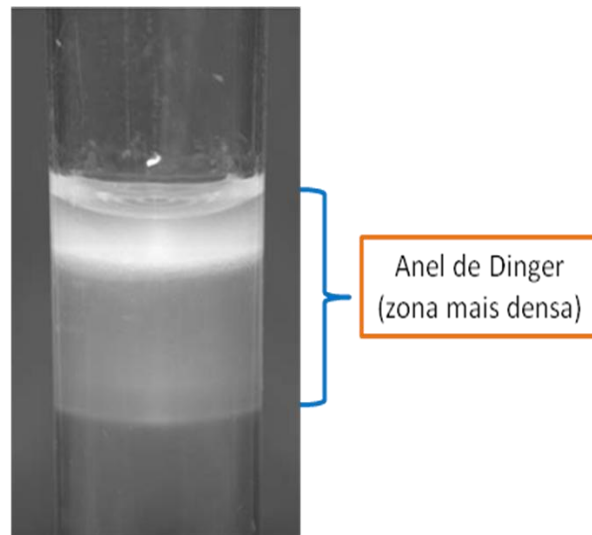


Figura 1.6. Tubo de EMJH semi-sólido com crescimento de leptospiros
(Fotografia do autor)

Amplificação do DNA (PCR)

No âmbito do diagnóstico da Leptospirose, a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) é um método (molecular) que amplifica fragmentos específicos de DNA leptospírico em material clínico, tal como soro, urina e sangue, e tem vindo a ser desenvolvida desde os anos noventa (Adler *et al.*, 2009).

Diversos protocolos de PCR com diferentes pares de *primers* (= sequências iniciadoras) desenhados para a detecção de leptospiros têm sido desenvolvidos. No entanto desde metade da década de noventa até ao presente, apenas alguns têm sido utilizados e avaliados na perspectiva clínica (Brown *et al.*, 1995; Merien *et al.*, 1995), ganhando ampla utilização para o diagnóstico, apesar de algumas reconhecidas limitações. São disso exemplo os *primers* descritos por Mérien e colaboradores, que ao amplificarem um fragmento de 331 pares de bases (pb), com base no gene *rrs* codificante da subunidade ribossomal 16S (16S rRNA), presente tanto nas leptospiros patogénicas como nas saprófitas, pode produzir um resultado falso-positivo pela eventual contaminação com leptospiros não patogénicas; por outro lado, o estudo feito por Gravekamp *et al.*, (1993) e avaliado por Brown *et al.*, (1995), com base no gene *secY*, obriga à utilização de um segundo par de *primers* para detectar o DNA de todas as espécies de leptospiros patogénicas, pois o primeiro par utilizado não amplifica os serovares pertencentes à espécie genómica *L. kirschneri* (Levett *et al.*, 2001; Adler *et al.*, 2009). No entanto, de forma a

ultrapassar estas e outras limitações desta técnica, tem-se vindo a apostar cada vez mais na pesquisa do DNA de *Leptospira* através do PCR em tempo real com a utilização de sondas *TaqMan* ou sondas marcadas com fluorocromos, por exemplo, pelo marcador SYBR green (Adler *et al.*, 2009).

A vantagem da abordagem molecular é permitir antecipar o diagnóstico da Leptospirose numa fase inicial da doença, face à presença de leptospiros e na ausência de anticorpos detectáveis pelos métodos indirectos.

Importa, no entanto, ter sempre presente que o PCR tem algumas desvantagens no contexto da Leptospirose. São disso exemplo: *i*) a necessidade de se dispor de uma concentração de bactérias mínima, nas amostras biológicas a analisar, que permita a amplificação de DNA leptospírico; e *ii*) o facto da referida concentração de DNA ser dependente do êxito da lise celular, para a qual contribui a difícil solubilização das leptospiros que não é um processo simples, dadas as características bioquímicas da respectiva parede celular.

Uma outra limitação desta técnica molecular (PCR convencional ou *nested*-PCR) é o facto de apenas permitir diferenciar estirpes saprófitas e patogénicas, não permitindo determinar o serovar da estirpe infectante, o que não deixa de ser uma desvantagem dada a importância epidemiológica de que essa informação se reveste. Estas limitações fazem com que o PCR não seja utilizado como abordagem laboratorial na rotina do diagnóstico da Leptospirose.

Ao nível da investigação, no entanto, tem-se assistido nos últimos anos, ao desenvolvimento de outras técnicas moleculares, para identificação dos serovares de *Leptospira*, como segue: *i*) hidrólise do DNA amplificado por restrição enzimática [*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)] (Herrmann *et al.*, 1992); *ii*) sequenciação do gene 16S rRNA (Morey *et al.*, 2006); *iii*) análise do *Número Variável de Repetições em Tandem* [*Variable Number Tandem Repeat* (VNTR)] (Majder *et al.*, 2005); e mais recentemente, *iv*) a técnica de *Tipagem de Sequências Multilocus* [*Multilocus Sequence Typing*] (MLST) (Ahmed *et al.*, 2006; Thaipadungpanit *et al.*, 2007). Esta última abordagem perspectiva uma caracterização mais simplificada para a identificação das espécies genómicas de *Leptospira*, permitindo uma normalização da informação obtida, através de bases de dados “online”, que viabilizam o acesso mundial aos dados moleculares e epidemiológicos (Adler *et al.*, 2009).

1.2.6.2. Métodos Indirectos

Devido às limitações das técnicas bacteriológicas clássicas e mesmo as de biologia molecular, as reacções serológicas são as principais técnicas utilizadas na rotina do diagnóstico laboratorial. Estão, assim, disponíveis nos laboratórios considerados de Referência, várias técnicas sorológicas, tais como: a Técnica de Aglutinação Macroscópica sobre lâmina (MACRO) e a técnica *ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent-Assay*), utilizadas como técnicas de rastreio, e a Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM), que é ainda hoje considerada a técnica da referência.

Teste de Aglutinação Macroscópica (MACRO)

Esta técnica consiste na utilização de uma suspensão antigénica, simples (com um único antigénio) ou mais complexa (incluindo vários antigénios), representativa do ou dos serovares mais prevalentes numa determinada região, o que contribui para o aumento da respectiva sensibilidade. Contudo, a especificidade é baixa, pois pode produzir resultados duvidosos, devido a reacções cruzadas com agentes de outras patologias. No entanto, por não requerer equipamento especial, pode ser realizada em laboratórios com menos recursos, em particular em regiões endémicas, sendo utilizada como técnica de rastreio, na detecção precoce de anticorpos específicos (± 2 dias), comparativamente à técnica de referência (TAM).

Teste ELISA

Outro importante teste no âmbito do diagnóstico imunológico é o teste ELISA que, no caso, utiliza um antigénio leptospírico a revestir as placas de microaglutinação. O soro a estudar é colocado em contacto com o antigénio, seguindo-se a respectiva incubação e lavagem. A reacção inicial antigénio-anticorpo vai ser evidenciada pela utilização de um conjugado marcado com uma enzima e respectivo substrato cromogénico. A intensidade da reacção colorimétrica é proporcional à quantidade de anticorpo presente no soro a estudar (WHO/ILS, 2003; Vieira, 2006).

Testes ELISA têm sido amplamente utilizados para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira*, principalmente imunoglobulinas do tipo M (IgM), durante a primeira semana de infecção, e do tipo G (IgG) na fase mais tardia. Uma das vantagens deste

teste sobre a TAM é a de detectar mais precocemente uma resposta imune a esta infecção bacteriana (Levett, 2001).

Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)

A TAM é a técnica considerada *gold standard* para o diagnóstico da Leptospirose, sendo ainda hoje o teste de referência preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a pesquisa de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., com uma sensibilidade e especificidade de 92% e de 95%, respectivamente.

Contudo, a utilização e manutenção de uma bateria de referência constituída por culturas vivas de serovares patogénicos, representativos dos principais serogrupos, impede o uso da TAM na generalidade dos laboratórios clínicos. De salientar que esta bateria de estirpes de *Leptospira* deve incluir ainda os serovares mais prevalentes e, sempre que possível, isolados na região e/ou País, de modo a incrementar a sensibilidade do teste (Vieira, 2006; Adler, 2009). Na Tabela 1.2 estão representados os serovares recomendados como bateria de antígenos de referência a incluir na detecção de anticorpos específicos anti-*L. interrogans* s.l. (WHO/ILS, 2003).

Importa referir igualmente a importância de incluir, na bateria de serovares de referência, uma estirpe saprófita pertencente a *L. biflexa* (ex: Patoc I), uma vez que esta pode dar a indicação de infecção por *L. interrogans* s.l. de uma estirpe desconhecida ou rara, num determinado local. Com efeito, a estirpe saprófita irá mostrar uma reacção cruzada com os anticorpos específicos produzidos contra os serovares patogénicos, sugerindo uma infecção por *Leptospira* sp. (Vieira, 2006).

Tabela 1.2 Bateria dos antígenos de referência de serovares de *Leptospira* spp. a incluir no diagnóstico imunológico da leptospirose humana pela TAM nos laboratórios de referência (WHO/ILS, 2003; Vieira, 2006).

Serogrupo	Serovar	Estirpe
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellonis	Castellón 3
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
Javanica	Poi	Poi
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Mozdok	5621
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Sejroe	M 84
Sejroe	Wolffi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
Semarang *	Patoc	Patoc I

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

Do ponto de vista da execução, a TAM é realizada geralmente em duas etapas distintas:

1ª etapa – Avaliação da reacção dos soros ‘problema’ na diluição inicial adoptada pela OMS (1:50), face aos antígenos de referência (culturas vivas, com cerca de 4 a 14 dias de crescimento e uma densidade de cerca de 10^8 células/ml). Salienta-se o facto de, em regra, e como referido, serem utilizadas estirpes isoladas localmente, além dos antígenos representativos dos diferentes serogrupos patogénicos existentes (WHO/ILS, 2003).

Esta etapa permite identificar quais os soros reactivos face aos serovares presentes, através da observação microscópica da ocorrência de aglutinação que evidencie uma reacção antígeno-anticorpo [antígenos (=serovares) e os anticorpos específicos presentes no soro]. A aglutinação para ter valor diagnóstico, isto é, para ser considerada significativa nesta primeira abordagem, tem de corresponder à ausência de leptospiros livres ou à presença de menos de 50% das mesmas, após a reacção. Os serovares com os quais se observou a referida aglutinação são sujeitos, na etapa

seguinte, a nova reacção, com o(s) soro(s) problema.

2ª etapa - Diluições seriadas ao dobro (1:100, 1:200, 1:400, ..., 1:3200; ...) dos soros 'problema' face aos antigénios (serovares) que mostraram reactividade valorizável (número de leptospiras livres inferior a 50%) na primeira etapa do teste, o que permite a respectiva titulação de cada serovar/estirpe reactiva. Nesta fase, se o tempo de evolução da doença permitir uma interpretação correcta da cinética de anticorpos específicos, poder-se-á determinar de modo presuntivo o serogrupo da estirpe infectante, o que é uma das grandes vantagens desta técnica. É, porém, nesta fase que surgem as maiores dificuldades do teste, dada a subjectividade da leitura do título terminal (*cut-off*) e daí a necessidade de pessoal especializado e treinado para o fazer. O título terminal do teste é lido até à diluição em que 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas.

Internacionalmente, está estabelecido um título de 1:100, como indicador de seropositividade em áreas não endémicas, sendo de 1:800 em áreas endémicas, dada a ocorrência de uma reactividade residual. No entanto, para alguns laboratórios, entre os quais se inclui o da ULBL, é desde há muito assumido o título de 1:160, dado uma grande parte da casuística do referido laboratório tem incluído, nas últimas duas últimas décadas, doentes da Região Autónoma dos Açores, que se sabe tratar-se de uma região endémica para a Leptospirose. De facto, tem-se verificado que existe uma realidade 'epidemiológica' Portuguesa, que se caracteriza por uma acentuada frequência de doentes hospitalizados com quadros de Leptospirose confirmada, cujos títulos, embora positivos, são baixos; daí ter havido a necessidade de baixar o *cut-off*, para se assegurar que nenhum doente é excluído de um possível diagnóstico de Leptospirose (Vieira *et al.*, 2006).

Face ao exposto ficam perceptíveis as diversas vantagens desta técnica, embora não esteja isenta também de algumas desvantagens: *i)* não permitir a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* antes de 5 a 7 dias após o início dos sintomas clínicos, dado que a produção dos mesmos e a conseqüente elevação máxima dos respectivos títulos é alcançada apenas a partir da terceira semana da doença (Turner, 1968); *ii)* a confirmação do diagnóstico clínico obrigar a uma segunda amostra sérica colhida alguns dias (geralmente uma semana) após a primeira colheita, para se demonstrar que ocorreu seroconversão com um aumento significativo (quatro vezes superior ao título do primeiro soro); e ainda *iii)* ainda o

facto das reacções negativas em amostras únicas nem sempre traduzirem a inexistência de infecção por *L. interrogans* s.l..

Importa ainda ter presente que a interpretação da sorologia no início da doença pode não ser correcta devido à eventual existência de reacções cruzadas, paradoxais ou residuais (Levett *et al.*, 2001).

1.2.7. Tratamento, prevenção e controlo

1.2.7.1. Terapêutica

O objectivo do tratamento da Leptospirose é controlar a infecção antes que se instale a forma grave da doença, que pode levar a danos irreparáveis, particularmente nos rins, fígado e pulmões, com possível ocorrência de falência multi-orgânica e morte.

A antibioterapia, se for iniciada nos primeiros quatro dias da doença irá reduzir a duração desta, assim como atenuará os sintomas. Nos últimos anos tem sido recomendada a doxiciclina por via oral (100 mg), diariamente, durante uma semana, ou penicilina, 2.4 a 3.6 mU por dia, durante uma semana. Estes antibióticos têm mostrado resultados satisfatórios (Pacciarini *et al.*, 1992; WHO/ILS, 2003).

Em geral, a maioria dos antibióticos tem efeito sobre a infecção por leptospiras, excepto as sulfamidas e o cloranfenicol, sendo este último, mais aconselhado para o tratamento da Leptospirose animal. Assim, os antibióticos mais recomendados são a penicilina, a doxiciclina, as tetraciclinas, a eritromicina, a ampicilina, a amoxiciclina e a estreptomicina (Ellis *et al.*, 1985; Fajardo *et al.*, 1998, Merck, 2000 citado por Vieira, 2006).

1.2.7.2. Prevenção e Controlo

A Leptospirose está tão amplamente distribuída que se torna quase impossível uma prevenção em todas as situações e regiões onde ocorre. A melhor forma de prevenir a infecção é evitar e/ou reduzir o contacto com animais infectados, assim como águas e solos contaminados, que constituem para o Homem as maiores fontes de risco.

A prevenção deve, assim, ser dirigida para três aspectos principais: *i*) a prevenção individual; *ii*) o controlo dos hospedeiros de manutenção (reservatórios silváticos e/ou

domésticos); e *iii*) o conhecimento dos factores ecológicos que influenciam a distribuição das leptospiros (Vieira, 2006).

Considerando a emergência da doença, recomenda-se a promoção de profilaxia no viajante, em regra, através do uso de doxiciclina (200 mg/semana) sempre que o destino seja uma região tropical e, em particular se for endémica (Takafuji *et al.*, 1984). Também é aconselhável a vacinação dos grupos profissionais em risco de contrair a doença, nomeadamente os trabalhadores de arrozais, por ex. na China (Chen 1985; Levett 2001) ou os trabalhadores de esgotos em França (Waitkins, 1984), de forma a minimizar o número de casos de Leptospirose.

A vacinação de populações tem apresentado resultados muito satisfatórios, como é o caso de Cuba, onde o índice de protecção tem sido da ordem dos 100% devido à utilização da vacina preparada com os serovares prevalentes no País, não apresentando efeitos secundários no grupo alvo (Martinez *et al.*, 2004). Estes recursos são importantes nas áreas onde ocorrem os casos mais graves da Leptospirose.

Actualmente as vacinas disponíveis contra a Leptospirose são constituídas por células inteiras inactivadas que, atendendo à presença de LPS, conferem uma imunidade serovar específica, predominantemente humoral (Faine *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2003). Nos animais, a utilização destas vacinas polivalentes tem atingido o seu objectivo, isto é, proteger o animal da doença, não sendo porém, tão eficaz em portadores crónicos. (WHO/ILS, 2003).

No entanto, a vacinação não é ainda uma prática corrente em todo o Mundo, estando em curso investigação em diversos países no sentido de tornar a vacina mais potente.

Um programa de controlo eficaz deve ser desenhado com base no conhecimento da epidemiologia da Leptospirose da área a proteger, incluindo medidas para a prevenção e controlo desta zoonose, tais como: *i*) a utilização de vestuário e calçado protector; *ii*) a adopção de medidas de higiene pessoal, em situações de actividades de risco; *iii*) a realização de acções de desratização em áreas de risco; *iv*) a vacinação; *v*) a descontaminação dos locais; *vi*) a vedação dos pontos de água potencialmente contaminados; e *vii*) o esclarecimento da população sobre a doença, através de acções de educação e saúde (Levett, 2001; Collares-Pereira *et al.*, 2008, 2009).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Amostras e critérios de inclusão

2.1.1. População alvo

A população seleccionada foi constituída por um total de 164 doentes (127 ♂ e 37 ♀), com indicação clínica de Leptospirose e admitidos em hospitais do Continente, Açores e Madeira, cujas amostras séricas foram enviadas para a ULBL, durante os anos de 2007, 2008 e até Junho de 2009, no âmbito da respectiva prestação de serviços à comunidade (Quadro 2.1).

O critério estabelecido para a inclusão das amostras foi o tempo (número de dias) decorrido entre o início dos sintomas e a data de colheita das amostras de sangue (≥ 1 e < 7 ; mediana=5 dias).

Quadro 2.1. Distribuição dos soros por Região e género

		Soros			
		N	%	♂	♀
Continente		85	51,8	60	25
Açores	S.Miguel	56	34,1	46	10
	Terceira	17	10,4	16	1
	Faial	5	3,0	5	-
Madeira	Madeira	1	0,6	-	1
Total		164	100,0	127	37

De 49 (30%) dos referidos doentes foi possível dispor-se de uma segunda amostra sérica obtida 15 ou mais dias após a primeira colheita sérica. Embora estas amostras já não fizessem parte dos critérios de inclusão definidos no presente trabalho, foram igualmente analisadas pela TAM no sentido de avaliar a presença/ausência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., numa fase posterior da doença. Com efeito, este acompanhamento da evolução da cinética de anticorpos específicos permite, na maioria dos casos, confirmar o serogrupo presuntivo da estirpe infectante, sendo uma informação útil, também neste estudo, face aos

possíveis resultados positivos na abordagem molecular.

Foram ainda analisadas 21 amostras de urina. De acordo com o protocolo de procedimentos do laboratório, estas amostras foram, inicialmente, observadas por microscopia de fundo escuro, para possível detecção de formas suspeitas de *Leptospira sp.*. A fase de evolução da doença não foi um critério nestas amostras, uma vez que, na sua maioria, não foram acompanhadas de qualquer informação clínico-epidemiológica.

2.1.2. População controlo

Paralelamente, foram incluídos neste estudo dois grupos de controlo: **Grupo 1** - soros representativos da população saudável (dadores de sangue, $n_{DS}=16$); e o **Grupo 2** - soros de doentes seropositivos para outras patologias (Borreliose de Lyme, $n_{BL}=5$; Sífilis, $n_S=5$ e Malária, $n_M=5$).

Os soros dos dadores de sangue foram cedidos pelos Serviços de Hematologia do Hospital de Egas Moniz (Lisboa) e do Hospital do Divino Espírito Santo (Ponta Delgada, Açores), representando indivíduos saudáveis, aparentemente sem antecedentes clínicos ou epidemiológicos de Leptospirose.

Os soros de doentes com indicação de Sífilis e de Malária foram cedidos respectivamente, pelas UEI's de Doenças Sexualmente Transmissíveis e de Malária, e os de Borreliose de Lyme, disponibilizados pela UEI onde decorreu este trabalho (ULBL).

2.2. Análise Imunológica

Os soros das populações alvo e controlo foram primeiramente submetidos ao teste da aglutinação microscópica (TAM) e, posteriormente à análise molecular por PCR convencional e *nested*-PCR.

2.2.1. Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)

Para a realização do teste utilizou-se uma bateria de antigénios vivos (culturas frescas, com densidade aproximada de 10^8 células/ml), representando 21 serovares

pertencentes a 16 serogrupos de *L. interrogans* s.l. (incluindo cinco isolados locais), de acordo com o estabelecido para o diagnóstico laboratorial de rotina na ULBL (Tabela A.1, Anexo 1). Como representante das leptospiras saprófitas (controlo interno) foi usado o serovar Patoc do serogrupo Semarang. A descrição dos procedimentos práticos está incluída no Anexo 1.

Todos os soros (população alvo e controlo) foram testados na diluição 1:40, sendo os soros reactivos posteriormente sujeitos a novo teste com diluições seriadas ao dobro (1:80 a 1:2.560). Foi indicado como título terminal do teste, a diluição em que 50% ou mais das leptospiras se encontravam aglutinadas, por comparação com os respectivos controlos, considerando-se positivos os títulos correspondentes a diluições iguais ou superiores a 1:160. Importa recordar que a adopção da diluição de 1:160 como limiar de positividade, ao contrário do preconizado pela WHO (*vide* 1.2.6.2.), é justificada pela experiência da ULBL face à conhecida situação 'epidemiológica' da população Portuguesa e, em particular da Açoriana, que apresenta casos confirmados de Leptospirose com títulos mais baixos, apesar do carácter endémico desta patologia.

2.3. Análise Molecular

A amplificação de DNA leptospírico foi efectuada com o recurso a dois tipos de PCR, com a seguinte designação: PCR convencional (*primers* G1-G2, A-lipL21 e U-lipL21) e *nested*-PCR (A-lipL32 com dois pares de *primers*).

A sensibilidade dos *primers* utilizados foi inicialmente aferida, utilizando DNA extraído de culturas dos serovares Arborea e Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans* s.l., com densidade conhecida (10^7 células/ml), em oito diluições seriadas de base 10, até 1 bactéria/ml. O DNA dos referidos serovares foi utilizado também como controlo positivo em todas as reacções efectuadas.

2.3.1. Extração de DNA

Foi dada particular atenção à extração e purificação do DNA do material biológico em estudo, conhecidas que são as inúmeras substâncias presentes neste tipo de

material (ex. hemoglobina, ureia, compostos fenólicos, metais pesados e outros) susceptíveis de inibir as reacções de PCR (Levett *et al.*, 2005).

Após alguns ensaios prévios, o DNA de todas as amostras (soro e urina) foi extraído e purificado através de um *kit* comercial [*Gentra Puregene Cell* (8x10⁸) da Qiagen®], de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2. Técnicas de PCR e respectivos *primers*

2.3.2.1 PCR com os *primers* (G1-G2)

Na amplificação do DNA utilizaram-se os *primers* G1 e G2 (Tabela 2.1), derivados respectivamente, das extremidades 5' (nucleótidos 1-20) e de 3' (nucleótidos 264 - 285), da sequência nucleotídica do plasmídeo recombinante pLIPs60, seleccionado da biblioteca genómica de DNA da estirpe RGA, serovar Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans* s.l., produzindo um fragmento de 285 pb (Gravekamp *et al.*, 1993).

Estes *primers* amplificam uma parte do gene *secY*, localizado no operão S10-spc-a que codifica proteínas ribossomais. Tal como o gene *rrs*, a sequência do gene *secY* alterna entre regiões conservadas e regiões variáveis (Hartskeerl, 2002).

Tabela 2.1 *Primers* (G1-G2) utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp

Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5' – 3')	Fragmento (pb)	Manufatura
secY	G1	CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT	285	MWG®
	G2	GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG		“

Para a reacção de amplificação, utilizou-se uma solução com o volume final de 25 µl, constituída por 5 µl (≈40 µg/ml) de DNA da amostra ‘template’ (=molde), tampão de reacção NH₄ 1X [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM tris-HCl (pH 8,8)] (Bioline®), 3 mM MgCl₂ (Bioline®), 250 µM de cada dNTP (Bioline®), 1 µM de cada *primer* (Tabela 2.1), 1U da *Taq* polimerase (Bioline®) e água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas num termociclador MyCycler (BioRad®) programado

com as condições óptimas de amplificação (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Condições óptimas de PCR com os *primers* (G1-G2)

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação	94	2 min	
Ligação dos <i>primers</i>	55	2 min	32
Elongação	72	3 min	
Elongação final	72	7 min	1

2.3.2.2. *nested*-PCR com os *primers* A-lipL32

Para o ensaio de *nested* – PCR, foram utilizados os *primers* A-lipL32 desenhados numa região do gene *lipL32* que codifica a proteína de superfície com o mesmo nome (LipL32), utilizando para tal o vector NTI 5.0 (Informax Inc; Bethesda, Maryland, USA). Um segundo par de *primers* foi desenhado de forma a amplificar uma outra região dentro da anteriormente amplificada, aumentando assim a sensibilidade do método, como descrito por Jouglard e col. (2006) (Figura 2.1).

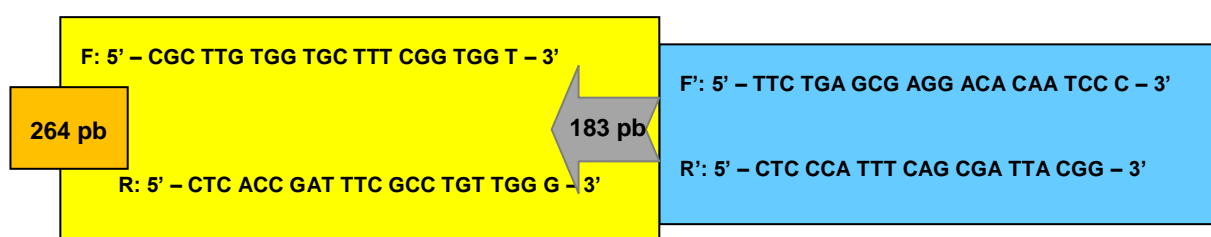


Figura 2.1. *Primers* A-lipL32 utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp

1ª Reacção de PCR – Neste primeiro PCR, utilizou-se uma solução com o volume final de 25 µl constituída por 10 µl (≈40 µg/ml) de DNA molde da amostra, tampão de reacção NH₄ 1X [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM tris-HCl (pH 8,8)] (Bioline[®]), 2,5 mM MgCl₂ (Bioline[®]), 0,5 mM de cada dNTP (Bioline[®]), 1 pmol de cada *primer* (Figura 2.1), 1U da *Taq* polimerase (Bioline[®]) e água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

2ª Reacção de PCR - Nesta amplificação, preparou-se uma solução igual à do 1º PCR, à excepção do volume de DNA que nesta reacção foi apenas de 1µl do produto de amplificação do 1º PCR, e ajustado o volume de água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

Os tubos com as soluções foram colocados num termociclador MyCycler (BioRad®) programado com as condições óptimas de amplificação (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Condições óptimas (da 1ª e 2ª amplificação) com os *primers* A-lipL32

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min	1
Desnaturação	94	1 min	
Ligação dos <i>primers</i>	55	1 min	32
Elongação	72	1 min	
Elongação final	72	7 min	1

2.3.2.3. PCR com os *primers* A-lipL21

Nesta amplificação utilizou-se o protocolo descrito por Cheema e col. (2007), onde os *primers* A-lipL21 foram desenhados a partir de uma sequência de *L. kirschneri*, serovar Grippotyphosa (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 *Primers* A-lipL21 utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp

Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5' – 3')	Fragmento (pb)	Manufatura
<i>lipL21</i>	F	CGC GGT CGA CAT GAT CAA TAG ACT TAT AGC TC	561	MWG®
	R	CGC GCT GCA GTT ATT GTT TGG AAA CCT CTT G		"

Utilizou-se para a amplificação uma solução com o volume final de 25 µl, constituída

por 1 μ l (\approx 40 μ g/ml) de DNA molde de cada amostra, tampão de reacção NH₄ 1X [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM tris-HCl (pH 8,8)] (Bioline[®]), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline[®]), 0,1 mM de cada dNTP (Bioline[®]), 1 μ M de cada *primer* (Tabela 2.4), 1U da *Taq* polimerase (Bioline[®]) e água ultra-pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas num termociclador MyCycler (BioRad[®]) programado com as condições óptimas de amplificação (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Condições óptimas de PCR com os *primers* (A-lipL21)

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min	1
Desnaturação	94	1 min	
Ligação dos ' <i>primers</i> '	55	45 seg	30
Elongação	72	45 seg	
Elongação final	72	6 min.	1

2.3.2.4. PCR com os *primers* U-lipL21

A amplificação foi efectuada de acordo com Dunbar e col. (informação pessoal), cujos *primers* se encontram descritos na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 *Primers* (U-lipL21) utilizados na amplificação de DNA de *Leptospira* spp.

Gene	<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica (5' – 3')	Fragmento (pb)	Manufatura
<i>lipL21</i>	F	AGA GAT ACG AAT CCA AAA GAC TGG	280	MWG [®]
	R	TCG TAA ACA CCA ACT CCT TTT AC		"

Utilizou-se para a amplificação uma solução com o volume final de 25 μ l, constituída por 2 μ l (\approx 40 μ g/ml) de DNA molde, 12,50 μ l de BioMix Red MgCl₂ 1,5 mM (Bioline[®]), 120 nM de cada *primer* (Tabela 2.6), 1U da *Taq* polimerase (Bioline[®]) e água ultra-

pura autoclavada para perfazer o volume final.

As soluções foram colocadas num termociclador MyCycler (BioRad®) programado com as condições óptimas de amplificação (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 Condições óptimas de PCR com os *primers* U-lipL21

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96	5 min	1
Desnaturação	96	1 min	
Ligação dos “ <i>primers</i> ”	60	30 seg	70
Elongação	72	30 seg	
Elongação final	72	7 min.	1

2.4. Visualização dos produtos amplificados (DNA)

Os produtos amplificados (DNA) foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 2%. Preparou-se o gel por dissolução de 2,0 g de agarose pura (Bioline®), em 100 ml de tampão TAE 1X (0,04 M Tris-HCl a pH 8.0; 0,002 M EDTA; 0,02 M acetato de sódio)(Sigma-Aldrich®) ao qual se adicionou brometo de etídio para uma concentração final de 0,5 µg/ml. Após polimerização, o gel foi colocado na tina de electroforese com tampão TAE 1X. Aplicou-se no gel um volume de 5 µl do produto de PCR de cada amostra, incluindo os controlos (negativos e positivos), a que se adicionou previamente 2,0 µl de solução tampão de amostra (*loading buffer*) (Bioline®).

Simultaneamente com as amostras, utilizou-se sempre um marcador de massa molecular de 100 pb (BioRad®), para identificar, por comparação, a dimensão do fragmento amplificado. Na electroforese aplicou-se uma corrente eléctrica de 100 V durante 60 minutos. A visualização dos produtos de amplificação no gel efectuou-se sob luz ultravioleta, sendo de seguida analisados e fotografados com recurso a equipamento de imagem Dolphin-1D *Gel Image Analysis Software* (Wealtec®).

2.5. Análise de Dados

Para a análise das variáveis sócio-demográficas e clínico-epidemiológicas dos doentes com suspeita clínica de Leptospirose, relevantes para este estudo, foi construída uma base de dados (*Microsoft Office Access*, versão 2007).

Foi também determinado o Título Geométrico Médio (TGM) dos títulos obtidos pela TAM de acordo com Sokal & Rohlf (1969), utilizando a seguinte fórmula matemática:

$$TGM = \frac{\text{anti log } \sum \log^* n}{N}$$

em que o TGM é o valor do anti-logaritmo do somatório dos logaritmos de cada um dos títulos da TAM, vezes 'n', sendo este, o número de vezes que se observa cada um desses títulos, sobre 'N', que representa o número total de soros analisados positivos.

Para a avaliação da concordância entre os resultados obtidos nas diferentes abordagens diagnósticas utilizou-se o teste *Kappa* (*K*). Este teste é uma medida decimal que permite evidenciar a concordância entre dois testes distintos. Um valor de (*K*) superior a 0,81 indica que existe uma concordância favorável entre testes.

O teste de Qui-quadrado (χ^2) e/ou de Fischer (quando necessário) foram utilizados para a análise da associação entre variáveis, sendo o nível de significância adoptado de $p < 0,05$.

3.RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. População alvo

3.1.1. Caracterização da População

Dos 164 doentes que constituíram a amostra alvo do presente estudo e que obedeceram aos critérios de inclusão (*vide 2.1*), uma análise mais detalhada mostrou que a maioria (60,4%) se situa numa faixa etária que corresponde à idade activa profissional (25 - 64 anos), quer no Continente quer nos Açores (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Resultados da distribuição dos 164 doentes por Região, Género e grandes Grupo etários

	5 – 24		25 – 64		≥ 65		ND		TOTAL
	M	F	M	F	M	F	M	F	
Continente	2	2	38	8	19	13	1	2	85
Açores	12	-	44	8	11	3	-	-	78
Madeira	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Total	14	2	82	17	30	16	1	2	164
%	9,8		60,4		28,0		1,8		100,0

ND – não determinado

No que respeita à variável profissão/ocupação dos doentes, das áreas geográficas consideradas (Continente e Açores), com base na informação disponível (n=90; 54,9%), verificou-se que a construção civil e a agricultura foram os sectores mais representativos (Figura 3.1).

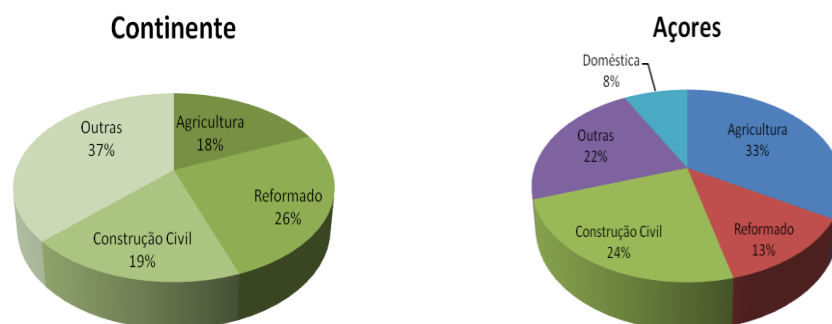


Figura 3.1 – Representação da população distribuída pelos diferentes sectores de actividade/profissão, nas duas Regiões

Da informação das fichas clínico-epidemiológicas foi possível conhecer a situação respeitante à variável terapêutica, tendo esta sido identificada em 56 (66%) dos doentes do Continente e em 46 (59%) dos doentes provenientes dos Açores. A doente proveniente da Madeira também foi alvo de intervenção terapêutica.

Os efeitos da terapêutica serão objecto de avaliação no ponto 3.3.2.

3.2. Análise Imunológica

Os resultados da detecção de anticorpos específicos pela Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) demonstraram uma seropositividade global de 13,4% (22⁺/164), sendo 16,5% no Continente e 9,0% nos Açores (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Resultados do Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) nas amostras analisadas (N=164), de acordo com os critérios de inclusão adoptados

	POSITIVOS	%	NC	%	NEGATIVOS	%	TOTAL
Continente	14	16,5	25	29,4	46	54,1	85
Açores	7	9,0	35	45,0	36	46,0	78
Madeira	1	100,0	-	-	-	-	1
Total	22	13,4	60	36,6	82	50,0	164

NC – Não Conclusivo (=Duvidoso)

Importa no entanto referir que se registaram 36,6% (60/164) de amostras com resultado não conclusivo (NC), o que conjuntamente com as amostras positivas demonstrou a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. em 82 (50%) do total de doentes.

A par da reactividade observada em cada região, foi também determinado o Título Geométrico Médio (TGM), cujos valores se indicam na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Resultados do Título Geométrico Médio (TGM) obtidos nos soros positivos e não conclusivos (NC) pela TAM, por região de proveniência

Região	TAM / POSITIVOS			TAM / NC		
	n	Intervalo dos Títulos	TGM	n	Intervalo dos Títulos	TGM
Continente	14	[1:320 – 1:2.560]	1141	25	[1:40 – 1:80]	45
Açores	7	[1: 320 – 1:2.560]	769	35	[1:40 – 1:80]	57
Madeira	1	[1:320]	316	-	-	-

Os resultados obtidos pela TAM nas 2^{as} amostras, correspondentes a uma evolução clínica superior ou igual a quinze dias, estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Avaliação imunológica pela TAM das 2^{as} amostras séricas

TAM (POS) - 2 ^a amostra (≥ 15 dias)					
Soros	Continente		Soros	Açores	
n	POS	%	n	POS	%
23	0	0,0	26	10	12,8

O estudo das 2^{as} amostras séricas confirmou a ocorrência de seroconversão em três doentes Açorianos, de que resultou o total de 10 (12,8%) positivos em 78 doentes analisados provenientes dos Açores. No Continente, não houve seroconversão em nenhuma das 2^{as} amostras dos 23 doentes analisados e, por isso, manteve-se o resultado final de 14 casos positivos decorrentes da 1^a amostra.

3.3. Análise Molecular

3.3.1. Sensibilidade e especificidade do PCR

A amplificação de DNA correspondente às diversas diluições das estirpes de referência, serovares Arborea e Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans* s.l., mostrou diferentes sensibilidades do PCR, consoante os *primers* utilizados (G1-G2, A-lipL32, A-lipL21 e U-lipL21) nos diferentes protocolos (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 Valores da sensibilidade das técnicas de PCR para os diferentes protocolos, de acordo com o *primer* utilizando

<i>Primers</i>	Sensibilidade [células/ml]
G1-G2	10^4
A-lipL32	10^2
A-lipL21	10^6
U-lipL21	10^4

O protocolo com os *primers* A-lipL32 (*nested*-PCR) foi o único que amplificou o DNA de *Leptospira* até à concentração de 10^2 , o que corresponde a 100 células/ml, como exemplificado na Fig. 3.2.

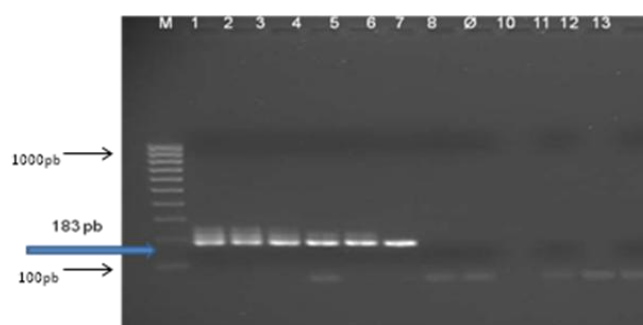


Figura 3.2 Representação da sensibilidade da técnica de *nested*-PCR para amplificação de DNA com os *primers* A-lipL32 (183 pb) de estirpes de *L. interrogans* s.l.: 1 a 8 – RGA (10^7 a 1 cel/ml); 10 e 11 – Controlos Negativos; 13 – Controlo Negativo *L. biflexa* (Patoc); M – Marcador molecular (100pb)

Foi ainda observada a ausência de amplificação de DNA do serovar representativo de *L. biflexa* (Patoc) com todos os *primers* utilizados, o que corrobora a especificidade dos mesmos para leptospiros patogénicas, como se observa na Fig. 3.2

Embora os resultados obtidos em três dos referidos protocolos tenham mostrado uma sensibilidade compreendida entre 10^2 e 10^6 células/ml, os 'soros problema' foram testados com todos os *primers*, excepto o A-lipL21, visto a sensibilidade deste ter sido a mais diminuta (10^6) de todos os ensaios realizados.

3.3.2. PCR com os *primers* G1-G2, A-lipL32 e U-lipL21

A aplicação dos três protocolos de PCR (G1-G2, A-lipL32 e U-lipL21) mostraram que o *nested-PCR*, com a utilização dos *primers* A-lipL32, amplificou o DNA leptospírico em 127⁺/164 (77,4%) amostras, cujo fragmento obtido apresentava um tamanho de 183 pb (Tabela 3.5 e Fig. 3.3 B).

Tabela 3.5 Resultados da amplificação do DNA leptospírico com os *primers* G1-G2, A-lipL32 e U-lipL21 para as amostras estudadas

	Continente (n=85)		Açores (n=78)		Madeira (n=1)		Total (n=164)	
	Pos (%)	Neg (%)	Pos (%)	Neg (%)	Pos (%)	Neg (%)	Pos (%)	Neg (%)
Primers								
G1-G2	6 (7,1)	79 (92,9)	13 (16,7)	65 (83,3)	1 (100,0)	-	20 (12,2)	144 (87,8)
A-lipL32	70 (82,4)	15 (17,6)	56 (71,8)	22 (28,2)	1 (100,0)	-	127 (77,4)	37 (22,6)
U-lipL21	5 (5,9)	80 (94,1)	6 (7,7)	72 (92,3)	-	1 (100,0)	11 (6,7)	153 (93,3)

Um outro resultado igualmente importante de referir é o valor diagnóstico do par de *primers* G1-G2 que apesar de significativamente inferior ao obtido com o protocolo anterior, detectou DNA leptospírico (fragmento com 285 pb) em 20⁺/164 (12,2%) das

amostras, correspondendo a seis doentes do Continente, treze dos Açores e um da Madeira. Apesar de não se ter verificado uma diferença significativa [$\chi^2 = 2,77$ com 1 grau de liberdade (gl), $p=0,096$] na distribuição dos doentes do Continente *versus* os dos Açores, para os *primers* G1-G2, constatou-se que o valor diagnóstico foi maior nos representantes da população Açoriana comparativamente à do Continente.

No que respeita aos ensaios de PCR com os *primers* U-lipL21, foi apenas possível detectar DNA específico (fragmento com 280 pb) em 11 doentes, tendo sido equitativa a distribuição dos mesmos pelas duas principais áreas geográficas em avaliação.

A Figura 3.3 (A – C) exemplifica as amplificações obtidas com os diversos *primers*, com destaque para o gel documentado em (B) referente ao ensaio com A-lipL32.



Figura 3.3 A – Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os *primers* G1-G2 (285pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Negativo; 19 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb);

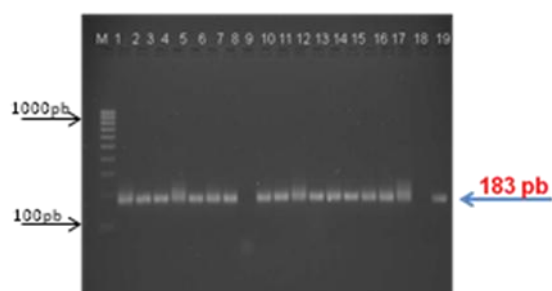


Figura 3.3 B – Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os *primers* A-lipL32 (183pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Negativo; 19 – Controlo Positivo (RGA); M – Marcador molecular (100pb);

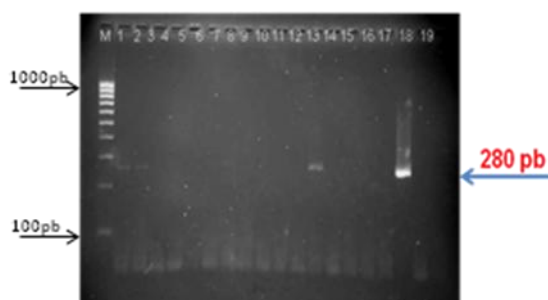


Figura 3.3 C – Resultados da amplificação de DNA leptospírico com os *primers* U-lipL21 (280 pb); 1 a 17 – Soros de doentes; 18– Controlo Positivo (RGA); 19 – Controlo Negativo; M – Marcador molecular (100pb);

A integração de todos os resultados laboratoriais obtidos através das duas abordagens (análise imunológica e molecular) permitiu construir o fluxograma (Fig.3.4) através do qual se resume a avaliação da resposta às questões decorrentes dos objectivos propostos neste trabalho.

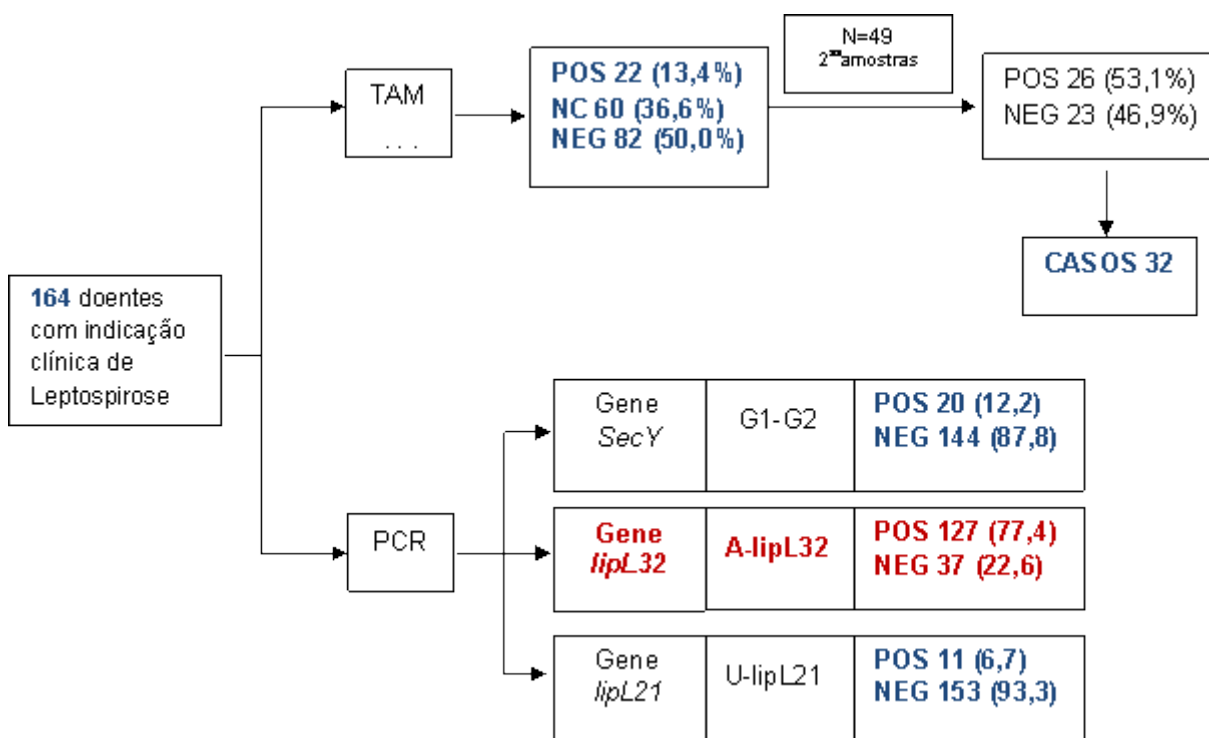


Figura 3.4 Fluxograma de diagnóstico e resultados dos doentes avaliados. TAM – Teste de Aglutinação Microscópica; PCR – Reacção em cadeia da polimerase; POS – Positivo; NEG – Negativo; NC – Não Conclusivo

Relativamente ao possível efeito “negativo” da terapêutica administrada em termos da amplificação do DNA leptospírico, verificou-se que a mesma não influenciou a detecção do DNA específico, conforme demonstrado para cada protocolo de PCR [**G1-G2** ($\chi^2 = 2,625$ com 1 gl, $p = 0,105$); **A-lipL32** ($\chi^2 = 0,106$ com 1gl, $p = 0,745$) e **U-lipL21** ($\chi^2 = 1,009$ com 1 gl, $p = 0,315$)], face à não confirmação de diferenças significativas entre os doentes com e sem terapêutica.

A análise da concordância entre os diferentes protocolos de PCR, através do teste *K* evidenciou um valor de 0,99 para todos os protocolos utilizados.

No que se refere à avaliação do resultado do *nested*-PCR *versus* o número de dias de evolução clínica, após início dos sintomas (Fig. 3.5.A), verificou-se que foram as amostras obtidas entre o terceiro e sexto dias que mais contribuíram para o total de casos positivos (109/127), enquanto que a maioria dos resultados (POS e NC) obtidos pela TAM (Fig. 3.5.B), corresponderam ao intervalo entre o quinto e o sexto dias (42/82).

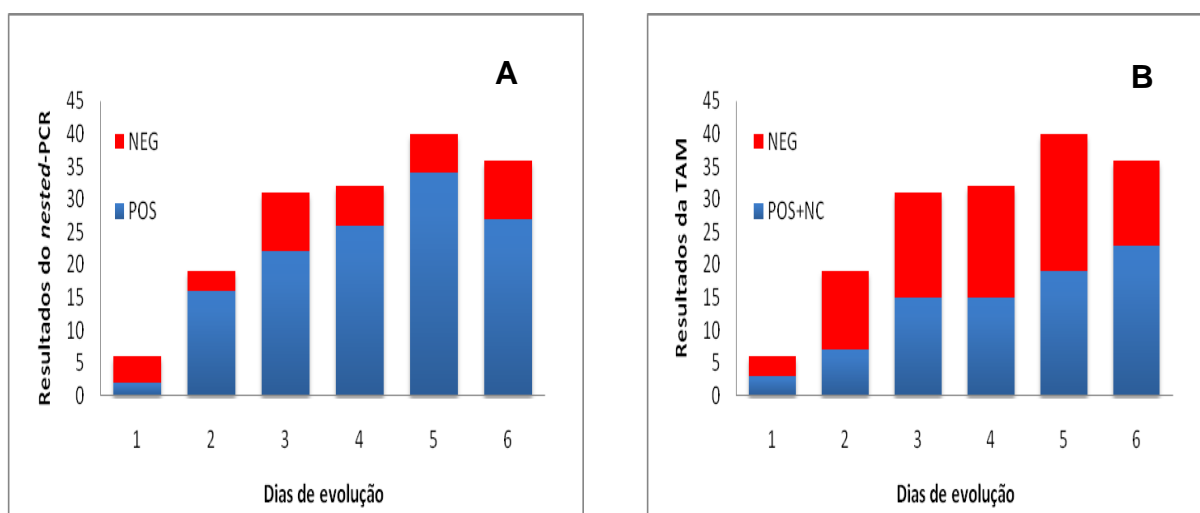


Figura 3.5 (A,B) Resultados do *nested*-PCR (A-lipL32) (A) e resultados da TAM (B) *versus* dias de evolução da doença

No que diz respeito às amostras de urina, os resultados obtidos revelaram a presença de DNA leptospírico em 4⁺/21 (19,0%) das mesmas. Também neste material biológico foi o protocolo com os *primers* A-lipL32 o que mostrou melhor desempenho.

3.4. População controlo

A análise dos resultados da população controlo constituída pelo *Grupo 1* (dadores de sangue) e *Grupo 2* (soros de doentes seropositivos para outras patologias: Borreliose de Lyme, Sífilis e Malária) cujos soros foram igualmente submetidos aos três

protocolos de PCR e à avaliação pela TAM, mostrou a ausência não só de DNA leptospírico, como de anticorpos anti-*L.interrogans* s.l. (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 Resultado da pesquisa de DNA de *Leptospira* e de anticorpos específicos na população controlo (*Grupo 1* - dadores de sangue) e (*Grupo 2* - doentes de Borreliose de Lyme, Sífilis e Malária)

População controlo	Soros (n)	Pesquisa de DNA			Pesquisa de Acs
		G1-G2	A-lipL32	U-lipL21	TAM
Grupo 1 Dadores de sangue	16	Neg	Neg	Neg	Neg
Borreliose de Lyme	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Grupo 2 Sífilis	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Malária	5	Neg	Neg	Neg	Neg

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A Leptospirose é (ainda) a zoonose com maior distribuição mundial, sendo considerada um problema de Saúde Pública também em Portugal. É uma patologia que continua a ser sub-diagnosticada, em parte devido a um espectro alargado de sinais e sintomas. As formas mais severas da doença podem evoluir rapidamente, para complicações multiorgânicas com um desfecho, por vezes, fatal. Por este motivo, continua a ser urgente a implementação de uma abordagem molecular que permita o diagnóstico precoce desta patologia em tempo útil.

No presente estudo, 164 amostras séricas humanas, obtidas numa fase precoce de Leptospirose, e previamente analisadas pela técnica serológica de referência (TAM), foram submetidas a duas técnicas de PCR com o objectivo acima referido .

Na primeira fase, procedeu-se à caracterização da população alvo e confirmou-se que a Leptospirose afectou predominantemente os homens adultos, em idade activa, seguindo a tendência universal nas zonas temperadas (Ciceroni *et al.*, 2000; Christova *at al.*, 2003 citado em Vieira, 2006); as mulheres apresentaram distribuição etária análoga. À semelhança de estudos anteriores (Levett, 2001; Collares-Pereira *et al.*, 2007), mais de 50% dos doentes analisados desenvolviam actividades agrícolas e/ou de construção civil, susceptíveis de representarem um factor de risco para a transmissão destes agentes zoonóticos.

Do total de indivíduos que constituíram a amostragem do presente trabalho, observou-se que mais de 50% estavam profissionalmente ligados a actividades agrícolas e/ou de construção civil, tendo sido este um factor de risco para a Leptospirose, como referido em estudos anteriores (Levett, 2001; Collares-Pereira *et al.*, 2007).

Os resultados da análise imunológica (pela TAM) confirmaram a presença de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* s.l. com títulos positivos e duvidosos em cerca de 50% dos soros analisados e uma seroreactividade análoga de acordo com a área de proveniência dos doentes: Continente (45,9%) e Açores (53,8%). Esta evidência poderá estar relacionada com o facto dos clínicos das áreas geográficas em estudo estarem mais sensibilizados para o diagnóstico laboratorial desta patologia, atendendo à intensidade da investigação desenvolvida nos últimos anos.(Collares-Pereira *et al.*, 2007). De salientar igualmente o facto de se tratarem

de áreas endémicas da doença e, por isso, com um maior contacto com roedores, enquanto reservatórios naturais dos agentes de doença. A informação dos valores dos títulos geométricos médios (TGM) de cada região, mais elevado no Continente (TGM=1141) do que nos Açores (TGM=769), traduz dois aspectos distintos: *i)* o recurso muito precoce dos doentes Açorianos ao diagnóstico clínico e laboratorial da Leptospirose, com a conseqüente redução da resposta imune na fase inicial da doença; *ii)* uma informação por vezes inexacta da duração da sintomatologia, após início das manifestações clínicas, em particular no Continente, que se reflecte num número importante de informações incorrectas relativamente a esse parâmetro (*e.g.*, doentes com dois e três dias de evolução clínica, ou seja, na fase de silêncio imunológico, são já detentores de uma resposta imune com títulos muito elevados, > 1:1280).

De facto, é de há muito conhecido que nos primeiros dias de evolução clínica os testes serológicos, incluindo a técnica de referência, não são eficazes, dada a ausência de anticorpos detectáveis (Levett, 2001), o que tem exponenciado o recurso a tecnologias de PCR para amplificação do DNA da bactéria em amostras clínicas de soro e e/ou urina (Gravekamp *et al.*, 1994).

Na presente investigação, foram assim optimizados e avaliados diversos protocolos de PCR, utilizando *primers* obtidos de diferentes genes (*secY*, *lipL21* e *lipL32*) com um grau considerável de conservação entre as leptospiros patogénicas, de modo a detectar a presença de DNA leptospírico, em particular, em amostras com serologia negativa, promovendo desta forma o diagnóstico precoce da Leptospirose, no início da doença.

O estudo comparativo dos resultados obtidos com a utilização dos *primers* A-lipL32 (*nested-PCR*) e U-lipL21 (PCR convencional), demonstrou que os primeiros evidenciaram uma eficácia muito acentuada, face à amplificação de DNA leptospírico em 77,4% (127⁺/164) dos soros analisados de doentes com suspeita de Leptospirose, por oposição aos segundos, que apenas amplificaram DNA leptospírico em 6,7% do mesmo universo de amostras. Estes dados corroboram estudos anteriores (Jouglard *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007) e confirmam a reconhecida importância de uma segunda amplificação (no PCR com os *primers* A-lipL32) no incremento do valor diagnóstico do teste como referido em 2006 por Jouglard e colaboradores.

Admite-se que a menor sensibilidade do PCR com os *primers* baseados no gene *lipL21* possa estar relacionada com o padrão de “expressão” da proteína homóloga (LipL21), dada a evidência de variações neste âmbito de acordo com: *i*) o tempo de infecção; *ii*) a gravidade da mesma; e *iii*) a heterogeneidade genética do “hospedeiro” humano como demonstrado por estudos levados a efeito por Cullen e col. (2003). Face ao exposto, é de inferir que a expressão do gene *lipL21* é tanto mais marcada quanto maior o tempo de evolução clínica da doença, após o início dos sintomas, como demonstrado em estudos de *follow-up* de Leptospirose anteriormente desenvolvidos (Vieira, 2006).

Quanto aos resultados obtidos nas amostras testadas com o par de *primers* G1-G2, (PCR convencional) verificou-se que a detecção de DNA leptospírico foi igualmente baixa (12,2%) quando comparada com o resultado obtido pelo *nested*-PCR (A-lipL32). No que respeita às duas populações em apreço (Açores e Continente), constatou-se que os referidos *primers* (G1-G2) amplificaram respectivamente, 16,7% e 7,1% das amostras. Na origem deste facto, estará a maior sensibilidade dos *primers* G1-G2 para amplificação de sequências de leptospiros pertencentes às espécies genómicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* em detrimento de *L. kirschneri* (Fonseca *et al.*, 2006). Por este motivo, os casos positivos por esta última espécie genómica (*L. kirschneri*) não foram identificados nos doentes do Continente reduzindo-se desta forma o valor diagnóstico deste teste molecular na referida área geográfica. Nos Açores, esta limitação não se verificou, uma vez que os serovares circulantes conhecidos, até à data, pertencem apenas às duas primeiras espécies [Vieira, 2006; Collares-Pereira *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, (*in press*)].

A análise da relação entre os resultados obtidos com o *nested*-PCR (A-lipL32) e os dias de evolução da doença registou uma distribuição normal, em que o número de amostras positivas pelo PCR tende a decrescer com o aumento dos dias de evolução. Este resultado está de acordo com o ciclo biológico das leptospiros no organismo, uma vez que representa a transição da fase leptospirémica (as bactérias estão na corrente sanguínea) para a fase imune (as bactérias começam a ser eliminadas da circulação sanguínea e dos tecidos/órgãos através de opsonização) (Adler *et al.*, 2009).

Relativamente às amostras de urina analisadas, observou-se uma percentagem importante (19,0%; 4⁺/21) de amostras positivas com o *nested*-PCR (A-lipL32), o que

corroborar a maior sensibilidade desta técnica relativamente às restantes, também neste tipo de material biológico. Contudo, a ausência de informação concreta sobre o número de dias de evolução da doença, aquando da respectiva colheita, não permite uma análise mais detalhada sobre a eficácia da técnica *versus* tempo óptimo de colheita da urina, após início dos sintomas.

No que respeita aos resultados obtidos para a população controlo não se observou reactividade pela TAM nem amplificação de DNA específico nas várias abordagens moleculares, reforçando desta forma a elevada especificidade dos *primers* testados na detecção de *Leptospira*. Este resultado já havia sido referido anteriormente por alguns autores (Van Eyes *et al.*, 1989; Merien *et al.*, 1992), ao testarem outros microrganismos, como *Treponema spp* e *Borrelia burgdorferi* s.l., cuja proximidade antigénica com as leptospirosas, é susceptível de causar resultados falso-positivos na amplificação de DNA leptospírico. Esta evidência confirma, assim, a elevada especificidade dos *primers* utilizados, para o género *Leptospira*.

Em conclusão, a avaliação molecular com *primers* específicos de três genes alvo, *secY*, *lipL21* e *lipL32*, permitiu a detecção de DNA de leptospirosas patogénicas em doentes cujas amostras séricas foram obtidas numa fase muito precoce da doença e do conjunto de resultados obtidos pode concluir-se que:

- O protocolo de *nested-PCR* com os *primers* A-lipL32 é o mais favorável para o diagnóstico precoce da Leptospirose (fase aguda);
- A utilização do referido protocolo é igualmente útil independentemente da origem geográfica (insular ou continental) dos doentes;
- Esta “ferramenta” molecular não deve desprezar, num contexto de rotina laboratorial, a utilização da técnica de referência (Aglutinação Microscópica) numa fase posterior de evolução da doença, para avaliação do serogrupo presuntivo da estirpe infectante;
- Por último, importa prosseguir a investigação da aplicação do protocolo de *nested-PCR* (A-lipL32) em amostras de urina obtidas, em paralelo com as amostras de sangue, de modo a reforçar a informação laboratorial com outro material biológico do mesmo doente, apesar de corresponder a uma fase (de leptospiúria) mais avançada da doença.

5.BIBLIOGRAFIA

- Acosta H, Moreno CH, Viáfara BD. (1994). Leptospirosis. Revisión de tema. *Colombia Médica*, **25**: 36-42.
- 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*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.12
- Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annal Clinic Microbiol Antimicrobial*, **5**:28.
- Berg H, Bromley DB & Charon NHW. (1978). Leptospiral motility. *In*: Stanier RY, Rogers HJ, Ward JB, (ed). Relations between structure and function in the prokaryotic cell. 28th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.285-294.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infect Dis*, **3**: 757-771.
- Brown PDC, Gravekamp DG, Carrington H. (1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*, **43**: 110-114.
- Champagne MJ, Higgins JR, Fairbrother JM, Dubreuil D. (1991). Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can J Vet Res*, **55**: 239-245.
- Cheema PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, Sandey M. (2007) Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL32* genes. *Ind J Exp Biol*. **45**(6): 568-73.
- Chen TZ. (1985): Development and present status of leptospiral vaccine and technology of vaccine production in China. *Jap J Bacteriol*, **40**: 755-762.
- Collares-Pereira, M. (1992). Contribuição para o estudo do Género *Leptospira* em Portugal. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, 300 pp.

Collares-Pereira M. (1994). *Leptospira* e leptospirosis: epidemiologia e diagnóstico laboratorial. In: *Cadernos de Doenças Infecciosas*, Vol. III, Eds. Antunes F. & Forte M, Faculdade de Medicina de Lisboa, p. 19-28.

Collares-Pereira M & Vieira ML. (2001). Fatal leptospirosis, Azores Islands. Report submitted by Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Lisbon, Portugal. *Week Epidemiol Rec*, **15**(76): 109-111.

Collares-Pereira M, Gonçalves L & Santos-Reis M. (2007). *Epidemiologia e Controlo da Leptospirose na Região Autónoma dos Açores*. Relatório Científico (USA Scientific Cooperative Agreement Nº 58-401-3-F185, 2004-2007). Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme e Unidade de Epidemiologia e Bioestatística do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa / Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 337 pp (+ Anexos; 174 pp).

http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=406608&showp_ars=true&fy=2008

Collares-Pereira M, Korver H, Cao Thi BV, Santos-Reis M, Bellenger E, Baranton G, Terpstra WJ. (2000a). Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiol Letters*, **185**: 181-187.

Collares-Pereira M, Korver H, Terpstra WJ, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Mathias ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci-Fonseca F. (1997). First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *Eur J Epidemiol*, **13**(4): 435-441.

Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P. (2000b). Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira Island (Azores). *Eur J Epidemiol*, **16**: 1151-1157.

Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Gonçalves L, Vieira ML, Flor L. (2008). Epidemiology and Control of leptospirosis in the Azores. Final Scientific Report (USA Scientific Cooperative Agreement N°58-401-3-F185, 2003-2008). Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme e Unidade de Epidemiologia e Bioestatística do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa / Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa / Laboratório Regional de Veterinária, Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário (Angra do Heroísmo), Lisbon, 26pp.

http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=406608&showp_ars=true&fy=2008.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev*, **28**(3):291-318.

Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. (2003). LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. *Infect Immun*, **71**(5): 2414-2421.

Dorigatti F, Brunialti MKC, Romero EC, Kallas EG, Salomão R. (2005). *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of OL-6. *Braz J Med Biol Res*, **38**: 909-914.)

Dutta TK & Christopher M. (2005). Leptospirosis – An overview. *Japi*, **53**: 545-551.

Edward A, Hodder, Staughton. (1990) Leptospirosis. Quoted in Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th edition. **3**: 619.

Ellinghausen HC & McCullough WG. (1965). Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res*, **26**: 45-51

Ellis WA. (1983). Recent developments in bovine. Leptospirosis. *Vet ann*, **23**:91-95

Faine S. (1964). Reticuloendothelial phagocytosis of virulent leptospores. *Am J Vet*, **25**: 830-835.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (1999). *Leptospira* and leptospirosis. 2nd (ed), Melbourne /Vic. Australia: MediSci, pp 272.

- Faine S., Adler B, Bolin C.&Perolat P. (2000). *Leptospira* and Leptospirosis. MediSci, Melbourne, Australia, 2nd edition, 272 pp..
- Falcão JM, Nogueira PJ, Matias Dias C, Pimenta ZP. (1999). Leptospirosis in Portugal: epidemiology from 1991 to (1997). *Eurosurv Month Arch*, **4**: 44-47.
- Fonseca C, Teixeira M, Romero E, Tengan F, Silva M, Shikanai-Yasuda M. (2006). *Leptospira* DNA detection for diagnosis of human leptospirosis. *J Infect*, **52**: 15-22.
- Gonçalves AT, Paiva C, Melo-Mota F, Machado L, Vieira ML, Carreira T, Nunes MS, Ahmed A, Harstkeerl RA, Hyde K, Collares-Pereira M. First isolation of human *Leptospira* strains (Azores, Portugal), *Int J Infect Dis*, (in press)
- Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA and Terpstra WJ. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*, **139**: 1691-700.
- Haake DA. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol*, **146**: 1491-1504.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matzunaga J, Levett PN, Bolin C. (2000)3. The leptospiral major outer protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, **68**: 2276-2285.
- He H, Wang W, Wu Z, Lv Z, Li j, Tan L. (2008). Protection of Guinea Pigs against *Leptospira interrogans* Serovar Çai by LipL21 DNA Vaccine. *Cel Mol Immun*, **5**(5): 385-391.
- Hartskeerl RA. (2002). Leptospirosis: Serveillance and Control. Reunión Científica Internacional "Leptospirosis 2001" 17-18 de mayo del 2001. *Rev Cubana Med Trop*, **54**: 52-80.
- Herrmann, JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. (1992). Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol*, **30**: 1696-1702.
- Johnson RC & Harris VG. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. 1. Growth at low temperatures. *J Bacteriol*, **94**:27-31.

- Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin AO. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. *Can J Microbiol*, **52**(8): 747–752.
- Kobayashi Y. (2001). Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother*, **7**: 10-15.
- Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Paxton H. (2001). Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**: 349-351.
- Levett PN. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, **14**(2): 296-326.
- Levett PN, Morey RE, Galloway R, Turner DE, Steigerwalt A, Mayer LW. (2005). Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*, **54**: 45-49.
- Martinez R, Pérez A, Quiñones MC, Cruz R, Álvarez A, Armesto M, Fernández C, Menéndez J, Rodríguez I, Baró M, Días M, Rodríguez J, Sierra G, Obregón AM, Toledo ME, Fernández N. (2004). Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Ver Panam Salud Publica*, **15**(4): 249–55.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 671-673.
- 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.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. (1995). Comparison of Polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis*, **172**: 281-285.
- Pacciarini ML, Savio ML, Tagliabue S, Rossi C. (1992). Repetitive sequences cloned from *Leptospira interrogans* serovar hardjo genotype hardjoprajitno and their application to serovar identification. *J Clin Microbiol*, **30**: 1243-1249.
- Palaniappan RUM, Ramanujam S, Chang Y. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis. *Curr Opin Infect* **20**: 284-292.

- Ristow P, Bourhy P, Weykamp C, McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Sain-Girons I, Ko AI, Picardeau M. (2007) The OmpA-Like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* **3**(7):e97.
- Sambasiva RR, Naveen G, Bhalla P, Agarwal SK. (2003). Leptospirosis in India and the rest of the World. *Br J Infect Dis*, **7**(3): 178-193.
- Sanford JP. (1990). Leptospirosis. *In: Harrison's Principles of Internal Medicine*, ed. 11th New York, McGraw-Hill Book, Inc., **1**: 652-655.
- Sulzer, CR & WL Jones (1980). Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. *In* US Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, HEW Public. No. (CDC), 80-8275, Georgia 30333, p 1-40.
- Sokal RR & Rohlf F. (1969). Biometry . San Francisco, Wh Freeman and Company.
- Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN. (1984). An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med*, **310**: 497-501.
- Thaipadungpanit J, Wulthiekanun V, Chirakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NPJ, Peacock SJ. (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, **1**: e56.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. (1988). The Spirochetes, *In: Hagan & Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA, 8th edition, p. 45 – 57.
- Tuner LH. (1968). Leptospirosis II. Serology. *Trans R Soc Trop Med. Hyg*, **62**: 880-889.
- Tuner LH. (1970). Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans R Soc Trop Med. Hyg*, **64**: 623-646.
- Van Eys, GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, TER Schegget J, Terpstra WJ. (1989). Detection of leptospire in urine by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **27**: 2258-2262.
- Vieira ML. (2006) Aspectos da caracterização antigenica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 301 pp.

- Vieira ML, Carreira T, Conceição V, Collares-Pereira M. (2007). lipL32 gene amplification: a promising tool in the early laboratory diagnosis of leptospirosis. *In* Livro de Resumos do Congresso de Microbiologia e Biotecnologia, 30 Nov, - 2 Dez., Lisboa, Portugal, p. 70.
- Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M. (2006). Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis*, **10**: 378-386.
- Vivian JP, Beddoe T, McAlister A, Wilce MCJ, Zaker-Tabrizi L, Troy S, Byres E, Hoke DE, Cullen PA, Lo M, Murray GL, Adler B, Rossjohn. (2009). Crystal Structure of lipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Mol Biol*, **387**: 1229-1238.
- Waitkins SA. (1984). An update on leptospirosis. *Commun Dis Rep*, **44**: 3-4.
- WHO/ILS. (WORLD HEALTH ORGANIZATION/INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY). (2003). Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control, 109 pp.
- Wolf JW. (1954). The laboratory diagnosis of leptospirosis. Thomas CC, Springfield, I, 11.
- Zhang YX, Geng Y, Bi B, He JY, Wu CF, Guo XK, Zhao GP. (2005). Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai. *Acta Pharmacol Sinica*, **26**(4): 453-461.

6. ANEXOS

TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (TAM) (em microplaca)

(TÉCNICA DE REFERÊNCIA PARA A LEPTOSPIROSE)

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

A técnica de aglutinação microscópica (TAM) continua a ser a *técnica de referência* para a Leptospirose, isto é, a única que só por si permite a identificação presuntiva do serogrupo da estirpe infectante.

Protocolo em uso na ULBL/IHMT

A técnica é efectuada em microplacas de fundo plano e baseia-se na reacção dos soros previamente diluídos (1:40), na fase de rastreio e, posteriormente, em diluições ao dobro (1:80, ... 1:2560), face aos antigénios de referência (serovares mantidos *in vitro*). Utilizam-se ainda estirpes isoladas localmente para além dos referidos antigénios representativos dos serogrupos patogénicos existentes, de forma a aumentar a sensibilidade do teste.

Reagentes e equipamento:

- “Antigénios vivos” – culturas de 4 a 13 dias em meio líquido EMJH com uma densidade aproximada de 2×10^8 células/ml, previamente examinadas em fundo escuro (**Tabela A.1**)
- Tampão PBS (pH 7,2 – 7,4)
- Microplacas de fundo plano
- Pipetas de Pasteur calibradas (1 gota \approx 34 μ l)
- Micropipeta de 5 a 50 μ l e micropipeta multicanal
- Microscópio de fundo escuro com objectiva de longa distância focal (x20) para leitura directa das microplacas
- Estufa de incubação a 37° C

Procedimento:

1. Diluição preliminar dos soros a 1:40.
2. Marcação das microplacas incluindo os antigénios, as diluições, o número dos soros problema e as testemunhas (T), de acordo com o seguinte esquema:

		Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag
D i l u i ç õ e s a o d o b r o	SORO X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	80	A											
	160	B											
	320	C											
	640	D											
	1280	E											
	2560	F											
	...	G											
	T	H											

3. Distribuição do soro diluído nos poços (1 gota) por cada antigénio presente, na linha A e B.
4. Distribuição do tampão: 1 gota, do poço 2 até à linha da testemunha (inclusive).
5. Execução das diluições seriadas (1:80 a 1:2560), com o auxílio da micropipeta multicanal, transferindo sempre igual volume da diluição anterior até à última diluição, na qual este volume é desperdiçado.
6. Adição de igual volume de antigénio (1 gota) a todas as diluições a testar e à testemunha da respectiva coluna.
7. Agitar cuidadosamente a placa e cobrir com tampa.
8. Incubar na estufa a 37° C, durante 2 horas.
9. Após a incubação, retirar as placas da estufa e observar directamente ao microscópio a existência de aglutinação, por comparação com a respectiva testemunha (controlo negativo).

Leitura das microplacas:

A intensidade da aglutinação (**Fig. A1**), por campo de observação e por comparação com o respectivo controlo negativo, deve ser registada de acordo com o seguinte critério:

0+++ = 75% ou mais de bactérias aglutinadas;

25+++ = 50 a 75% de bactérias aglutinadas;

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

+ / ++ = pequenos aglutinados ocasionais;

Negativo = ausência de aglutinação, com número de células idêntico ao do controlo negativo (testemunha).

Resultado: Considera-se a reacção positiva quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas, em regra, a partir da diluição mínima de 1:160.

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

Tabela A.1. Bateria de antígenos de *L. interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l. utilizada no Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) na ULBL.

Serogrupo	serovar	Estirpe
Australis	Australis	Ballico
Australis	Bratislava	Jêz Bratislava
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Ballum	Mus 127
Ballum	Arboreae	Arborea
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
Javanica	Poi	Poi
Mini	Mini	Sari
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Mozdok	5621
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
Sejroe	Hardjobovis	Lely 607
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
Semarang *	Patoc	Patoc I

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

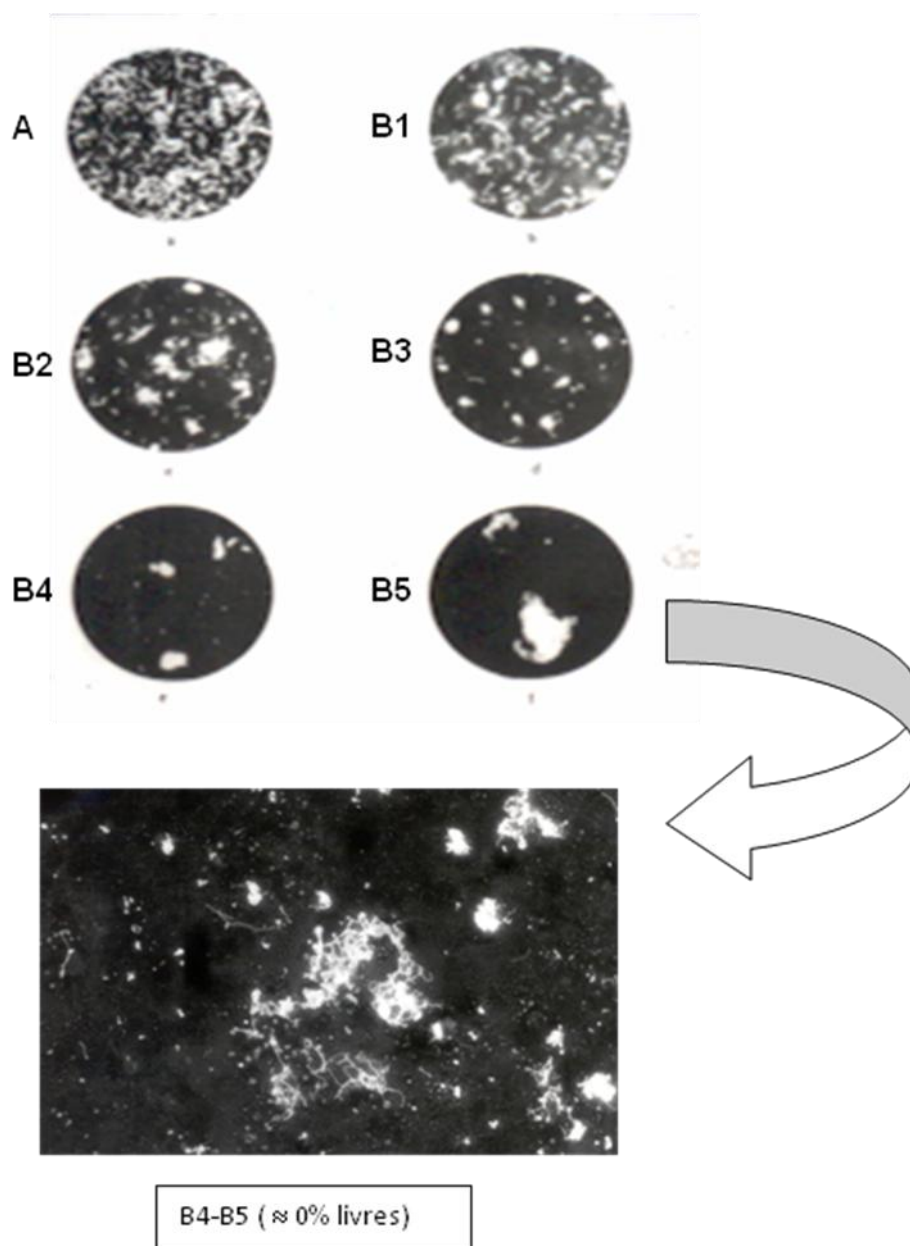


Figura A.1 Exemplo de uma aglutinação microscópica. A, Testemunha. B1-B5, intensidade crescente da aglutinação: B1 (75% livres), B2 (50% livres), B3 (25% livres), B4-B5 (\approx 0% livres) (adaptado de Collares-Pereira, 1992)