



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Leptospirose em Angola: estudo sero-epidemiológico em
pacientes febris com suspeita de malária e identificação de
Leptospira spp em reservatórios silváticos**

Elsa Maria dos Viveiros Fortes Gabriel

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS NA
ESPECIALIDADE DE MICROBIOLOGIA**

**Setembro
2016**



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Leptospirose em Angola: estudo sero-epidemiológico em
pacientes febris com suspeita de malária e identificação de
Leptospira spp em reservatórios silváticos

Elsa Maria dos Viveiros Fortes Gabriel

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biomédicas na Especialidade de Microbiologia, nos termos do artigo 11.º, nº 1, alínea b), do Regulamento Geral do 3.º Ciclo de Estudos Superiores Conducentes à Obtenção do Grau de Doutor pelo IHMT/UNL, publicado no Diário da República, 2.ª série, nº 233, de 19 de novembro de 2012.

Apoio financeiro:

Forças Armadas Angolanas – FAA
(NOTA 1269/GAB.CEMGFAA/00.35.05/10)

Fundação Calouste Gulbenkian
(FCG-Serv. Ed. Bolsas_Proc.114258/30Jul.10 e Proc.133494/Fev.14)

Orientadora

Doutora Maria Luísa Jorge Vieira

Investigadora Auxiliar

Unidade de Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Comissão tutorial

Doutor Jorge Atouguia

Professor Associado

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Doutor Joaquim Carlos Van-Dúnem

Professor Auxiliar

Faculdade de Medicina, Universidade Agostinho Neto (Angola)

Diretor Científico e Pedagógico do Hospital Pediátrico David Bernardino (Angola)

TRABALHOS RESULTANTES DA TESE

Artigo em revista internacional indexada, com revisão por pares:

Fortes-Gabriel, EMV, Carreira T, Vieira ML. First isolates of *Leptospira* spp from Rodents Captured in Angola. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(5), 2016, pp. 955-958 doi: 10.4269/ajtmh.15-0027.

(Vide Anexo 6.3, pág. 161)

Comunicações em Congressos, Conferências e Jornadas Científicas

No decurso da investigação foram apresentados em Portugal e no estrangeiro 16 comunicações sendo dez (10) em forma de poster [P] e seis (6) em comunicação oral [CO] dos quais elencamos as mais relevantes:

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2015. Leptospirosis in Angola: Seroepidemiological study among febrile malaria suspected patients. Congress of Microbiology and Biotechnology – MicroBiotec’15. 10-12nd Dec. Universidade de Évora, Évora - Portugal. [P] [*distinguido com o prémio de melhor apresentação em poster na sessão ‘Health Microbiology and Biotechnology’*].

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2013. Leptospirosis in Angola: first isolates of *Leptospira* spp from rodents and serological survey among human suspected of malaria. *Portuguese Congress of Microbiology and Biotechnology – MicroBiotec’13*, 06-08th December, Aveiro - Portugal. [CO]

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2013. First isolates of *Leptospira* spp from rodents captured in Luanda and Huambo (Angola). *8th Annual Scientific Meeting of International Leptospirosis Society - ILS*, 08-11th October, Fukuoka - Japan. [CO]

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2013. First isolates of *Leptospira* spp from Rodents and seroprevalence in patients with malária symptoms in Luanda and Huambo provinces (Angola). *8th Congress on Tropical Medicine and Tropical Health*. 10-13rd September, Copenhagen – Denmark. [CO]

Fortes-Gabriel EMV, 2013. Malária ou Leptospirose? *Jornada Científica da Sociedade Angolana de Medicina Tropical*, 13 de Junho, Luanda - Angola. [CO]

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2013. *Leptospira interrogans* s.l., em pacientes com síndrome febril suspeita de malária em duas Províncias de Angola: contribuição para o diagnóstico diferencial. *2º Congresso Nacional de Medicina Tropical*. 20-23rd de Abril, Lisboa - Portugal. [P]

Fortes-Gabriel EMV, Carreira T, Vieira ML, 2012. Leptospirosis in two Angolan's provinces: contribution for a differential diagnosis of patients with febrile illnesses. *XVIII International Congress of Tropical Medicine and Malaria*. 23-27th September, Rio de Janeiro – Brazil. (EP-electronic poster)

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese ao meu filho
Josemar Hugo, como legado de disciplina
e de 'amor ao próximo'.*

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta etapa de estudos, deixo aqui agradecimentos a todos quantos acompanharam e me ensinaram a trilhar por este caminho cheio de desafios e conquistas dignos de muito orgulho e alegria.

Agradeço aos dirigentes através dos quais foi concedido o apoio institucional para a realização do projeto de estudo, nomeadamente:

- Sua Excelência General Francisco Pereira Furtado – Chefe do Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas à data da autorização do presente estudo;
- Sua Excelência Tenente General Aires do Espírito Santo Africano – Chefe da Direção dos Serviços de Saúde do Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas;
- Ex.ma Sra Doutora Cleonice de Jesus Costa – Diretora do Instituto de Investigação Veterinária de Angola (IIVA), Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e Pescas;
- Ex.mo Sr. Dr. Frederico Juliana - Diretor Provincial da Saúde do Huambo, Ministério da Saúde;
- Ex.ma Sra Dra Filomena Carvalho – Diretora do Instituto Nacional de Saúde Pública, Luanda - Angola e Presidente do Comité Nacional de Ética em Saúde de Angola, à data da aprovação do presente estudo;
- Prof. Dr. Luís Bernardino – Diretor do Hospital Pediátrico de Luanda – David Bernardino, Ministério da Saúde de Angola, à data do início do estudo;
- Doutora Margarida Abecasis – Diretora do Serviço de Educação e Bolsas , Fundação Calouste Gulbenkian (Portugal).

Agradeço em especial ao Professor Doutor Filomeno Fortes que me incentivou a

estudar "Leptospirose em Angola" e também acompanhou o desenvolvimento dos trabalhos apoiando-me sempre que necessário.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário que 'abriu portas' para que se concretizasse o início do estudo, estabelecendo valiosos contactos com as entidades académicas.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Presidente do Conselho Científico do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) à data da aprovação do plano da tese (2010), pela forma como sempre me incentivou na investigação desenvolvida.

Quero deixar aqui marcado o nome de quem diretamente me apoiou na elaboração do trabalho que hoje finaliza. Agradeço portanto à estimada Inv.^a Doutora M^a Luísa Vieira, que ofereceu a sua dedicação completa e paciente desde a minha candidatura.

Também agradeço às Mestres Teresa Carreira e Mónica Nunes que acompanharam os trabalhos no laboratório, dando de si o seu melhor para me ensinar até ao mais elementar. À auxiliar de laboratório, Céu Mateus, pela companhia nas horas de trabalho na bancada.

Quero ainda agradecer aos professores que me apoiaram ao longo deste percurso em particular aos meus tutores Prof. Doutor Jorge Atouguia e Prof. Doutor Joaquim Van-Dúnem e também ao Prof. Doutor Ricardo Parreira (Unidade de Microbiologia Médica IHMT-UNL) pelo apoio na construção das árvores filogenéticas.

Um muito obrigada ao meu filho Josemar Hugo, razão pela qual me vi motivada em todos os momentos; aos meus irmãos Palmira (Sãozinha), M^a da Conceição (São), Jaime e Jorge que estiveram atentos e foram prestáveis em todas as situações; também aos sobrinhos e a todos os familiares que me deram o apoio de que necessitava particularmente à Filomena Amélia (Melita) e ao Constantino Lopes.

Agradeço ao meu companheiro sempre presente, Alcino Lima de cuja força e incentivo me encorajaram a prosseguir esta jornada.

Aos meus amigos e também colegas de curso em particular ao Dr. Kinanga e ao Dr. Nuno Marques. Agradeço também ao João Teixeira e à Filipa Dinis pelo carinho e pela integração social fora do meio académico.

Quero igualmente agradecer aos responsáveis e aos funcionários das Instituições envolvidas no estudo tanto em Luanda como no Huambo, nomeadamente: Tenente Coronel Bravo da Rosa (Diretor do Hospital Militar Regional do Huambo), Dr. Bandola (Médico Veterinário do Serviço de Patologia do Laboratório Regional de Luanda – IIVA) e Dr. Lelo Zola (Programa de Controlo da Malária- PNCM, no Huambo); ao pessoal técnico com destaque para Beatriz, Luísa e Jussara (Laboratórios Regionais de Luanda e do Huambo – IIVA, respetivamente) assim como os restantes membros das equipas de trabalho do IIVA, PNCM, Hospitais e Centros de Saúde.

Agradeço em particular aos pacientes do estudo que desinteressadamente consentiram dar a sua participação.

Agradeço finalmente ao **Estado Maior General das Forças Armadas Angolanas** e à **Fundação Calouste Gulbenkian** pela atribuição da bolsa de estudos

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, afetando cerca de um milhão de pessoas/ano. É causada por espiroquetas patogênicas do género *Leptospira* que colonizam os rins de roedores, os seus principais reservatórios. Em Angola a doença não é diagnosticada nem notificada, podendo ser confundida com a malária pela semelhança do seu quadro clínico. Assim, o presente estudo teve como objetivos: avaliar a sero-epidemiologia da leptospirose através da deteção de anticorpos (acs) anti-*Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.) em pacientes com síndrome febril suspeita de malária em Luanda e no Huambo e identificar *Leptospira* spp em roedores silváticos nas referidas Províncias.

Foram envolvidos no estudo (N=650) pacientes, a maioria dos quais, homens (n=339; 52,2%) e crianças de ambos os sexos (56,5%). Foi aplicado um inquérito clínico-epidemiológico e obtida uma amostra sérica de cada paciente. Estas amostras foram analisadas para pesquisa de acs anti-*L. interrogans* s.l. e para *Plasmodium* spp pela Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) e por Gota espessa, respetivamente. Ficou a saber-se que cerca de 86% (n=560) da população inquirida vive exposta a algum fator de risco de infeção por leptospiros, incluindo a presença de ratos junto das habitações.

Confirmou-se o diagnóstico de malária em 13,7% (89⁺/650) dos pacientes e foi observada a presença de acs anti-*L. interrogans* s.l., no soro de 130 (20%) pacientes, sendo que 62 (9,5%) destes, mostraram títulos $\geq 1:100$. Foram ainda identificados os serogrupos Australis, Louisiana, Icterohaemorrhagiae e Ballum como os mais predominantes, com títulos geométricos médios (TGM) entre 245,5 e 671,4. As taxas de seropositividade para *L. interrogans* s.l., foram idênticas para crianças e adultos. Os resultados dos inquéritos, face aos dados serológicos, mostraram associação estatística as variáveis: localização (Luanda vs Huambo) ($P < 0,001$), época das chuvas ($P = 0,002$), acúmulo de lixo ($P = 0,028$) e, em termos clínicos, icterícia ($P < 0,001$).

Em Luanda e no Huambo, capturaram-se 77 roedores com dois tipos de armadilha [guilhotina (n=40) e *Tomahwak*[®] (n=37)], esta última, manteve os animais vivos. Por análise morfométrica foram identificadas três espécies: *Rattus rattus* (n_{Rr}=43); *R. norvegicus* (n_{Rn}=21) e *Mus musculus* (n_{Mm}=13). Os roedores foram eutanasiados (n=37) e necropsiados (n=77) para extração dos rins e sangue para posterior análise (serologia, cultura e PCR). Após análise laboratorial detetou-se DNA leptospírico em 11⁺/77 roedores, tendo sido isoladas leptospiros patogênicas no tecido renal de 4⁺/37 roedores mantidos vivos após captura (*R. norvegicus* e *M. musculus*). A análise polifásica (serológica, fenotípica e molecular) identificou os ‘novos’ isolados como pertencentes às genoespécies *L. interrogans* sensu stricto (s.s.) e *L. borgpetersenii* (serovares Icterohaemorrhagiae e Arborea), respetivamente.

Estes achados são a primeira evidência inequívoca da presença de espécies patogênicas de *Leptospira* circulantes em Angola e que poderão ser a fonte primária da infeção, face aos dados obtidos na população humana.

O presente trabalho abre agora novos desafios de investigação nesta área quanto à perceção do padrão epidemiológico da leptospirose e consequente implementação do respetivo diagnóstico laboratorial em Angola. Acresce ainda referir que este estudo será um contributo para a indispensável inclusão da leptospirose no diagnóstico diferencial de doentes febris, face a outras doenças tal como malária.

Palavras chave: Sero-epidemiologia; roedores; *Leptospira* spp; malária; Angola

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis worldwide distributed, affecting one million of people/year. It is caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* that colonizes rodent's kidney, its main reservoir. In Angola the disease is not diagnosed or reported and can be confused with malaria by similarity of the clinical picture. So, the present study aimed to: evaluate the seroepidemiology of leptospirosis by detection of antibodies against *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.) among febrile malaria suspected patients in Luanda and Huambo and identify *Leptospira* spp from sylvatic rodents in the same Provinces.

For this study were involved (N=650) patients, mostly men (n=339; 52.2%) and children (56.5%) of both genders. It was applied a clinical and epidemiologic inquiry and obtained a serum sample from each patient. These samples were analysed to detect antibodies against *L. interrogans* s.l., and *Plasmodium* spp by Microscopic Agglutination Test (MAT) and microscopic blood examination (thick drop), respectively. About 86% (n=560) of the surveyed population is exposed to risk factors of infection by leptospires, including the presence of rats and mice near the dwellings.

Malaria diagnosis was confirmed in 13% (89⁺/650) patients and were observed antibodies against *L. interrogans* s.l., in the serum samples from 130 (20%) patients and 62 (9,5%) of these, showed agglutination titles $\geq 1:100$. The most predominant serogroups were identified as Australis, Louisiana, Icterohaemorrhagiae and Ballum with Geometric Mean Titre (GMT) between 245.5 and 671.4. The seropositivity rates for *L. interrogans* s.l., were similar for children and adults. Survey results compared to serological data showed statistical association with several variables such as, location (Luanda vs Huambo) (P <0.001), the rainy season (P = 0.002), the waste accumulation (P = 0.028) and, in clinical terms, jaundice (P <0.001).

In Luanda and Huambo were captured 77 rodents by two trap types [guillotine (n=40) and Tomahawk[®] (n=37)] this latter, keeps them alive. By morphometric analysis three species were identified: *Rattus rattus* (n_{Rr}=43), *R. norvegicus* (n_{Rn}=21) and *Mus musculus* (n_{Mm}=13). The rodents were euthanized (n=37) and necropsied (n=77) for extracting the kidneys and blood for further analysis (serology, culture and PCR). After laboratory analysis leptospiral DNA was detected from 11⁺/77 rodents and isolated pathogenic leptospires in kidney tissue of 4⁺/37 live trapped rodents (*R. norvegicus* and *M. musculus*). The polyphasic analysis (phenotypic, serological and molecular) identified the 'new' isolates as belonging *L. interrogans* sensu stricto (s.s.) and *L. borgpetersenii* genospecies (Icterohaemorrhagiae and Arborea serovars), respectively.

These findings are the first unequivocal evidence for the presence of pathogenic *Leptospira* species circulating in Angola and may be the primary source of the infection, matched to data obtained in the human population.

The present work opens now new challenges for research in this field towards the epidemiological leptospirosis pattern and the consequent implementation of the laboratory diagnosis in Angola. In addition, this study will contribute to the necessary inclusion of leptospirosis in the differential diagnosis of febrile patients, regarding other diseases such as malaria.

Keywords: Seroepidemiology; rodents; *Leptospira* spp; malaria; Angola.

ÍNDICE GERAL

TRABALHOS RESULTANTES DA TESE.....	v
DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
ÍNDICE GERAL.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
ÍNDICE DE QUADROS.....	xxv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO / ESTADO DA ARTE.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.3. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO.....	5
1.4. BACTERIOLOGIA.....	11
1.4.1. Morfologia.....	11
1.4.2. Nutrição, metabolismo e crescimento.....	12
1.4.3. Cultura e isolamento.....	13
1.4.4. Taxonomia e classificação.....	14
1.4.5. Classificação fenotípica (convencional).....	15
1.4.6. Classificação genotípica.....	16
1.5. BIOLOGIA MOLECULAR.....	18
1.5.1. Estudos do genoma do género <i>Leptospira</i>	18
1.5.2. Bases moleculares da patogénese das leptospiros.....	20
1.6. PATOGÉNESE E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	23
1.6.1. Interação leptospiros/ hospedeiro.....	23
1.6.2. Mecanismos da resposta imunológica vs formação de anticorpos anti- <i>Leptospira interrogans</i> s.l.....	24
1.7. EPIDEMIOLOGIA.....	26

1.7.1.	Fonte de infeção e transmissão.....	26
1.7.2.	Reservatórios.....	27
1.7.3.	Hospedeiro.....	29
1.7.4.	Definição de ‘caso’.....	31
1.7.5.	Leptospirose no Mundo.....	32
1.7.6.	Leptospirose em África.....	32
1.8.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	34
1.8.1.	Métodos diretos.....	34
1.8.2.	Métodos indiretos.....	36
1.9.	TRATAMENTO.....	39
1.10.	PREVENÇÃO E CONTROLO.....	39
2.	ESTUDO SERO-EPIDEMIOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE EM PACIENTES FEBRIS COM SUSPEITA DE MALÁRIA.....	43
2.1.	INTRODUÇÃO.....	45
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1.	Tipo de estudo.....	47
2.2.2.	Localização geográfica e caracterização das áreas do estudo	47
2.2.3.	População do estudo.....	50
2.2.4.	Aspetos éticos.....	50
2.2.5.	Inquérito sobre dados clínico-epidemiológicos.....	51
2.2.6.	Obtenção de amostras biológicas e análise laboratorial.....	51
2.2.7.	Deteção de DNA de <i>Leptospira</i> spp.....	56
2.2.8.	Análise estatística dos dados.....	57
2.3.	RESULTADOS.....	59
2.3.1.	Características da área do estudo.....	59
2.3.2.	Características da população do estudo.....	59
2.3.3.	Resultados laboratoriais.....	65
2.3.4.	Características epidemiológicas dos pacientes com infeção/ presença de anticorpos anti- <i>L. interrogans</i> s.l.	68
2.3.5.	Características clínicas da infeção.....	73
2.3.6.	Comparação dos resultados com estudos subsequentes realizados no âmbito das síndromes febris em Angola.....	74

2.4. DISCUSSÃO.....	77
3. IDENTIFICAÇÃO DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP EM RESERVATÓRIOS SILVÁTICOS.....	83
3.1. INTRODUÇÃO.....	85
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
3.2.1. Área do estudo.....	87
3.2.2. População de roedores.....	87
3.2.3. Aspectos éticos.....	88
3.2.4. Atividade laboratorial (em Luanda e no Huambo).....	89
3.2.5. Caracterização dos isolados de <i>Leptospira</i> spp.....	95
3.2.6. Análise dos soros de roedores pela TAM.....	99
3.2.7. Detecção de DNA de <i>Leptospira</i> spp em tecido renal e sequenciação.....	99
3.2.8. Análise filogenética.....	101
3.2.9. Análise estatística dos dados.....	101
3.3. RESULTADOS.....	102
3.3.1. Área do estudo e população de roedores.....	102
3.3.2. Cultura do tecido renal/ obtenção dos isolados.....	106
3.3.3. Análise dos soros de roedores pela TAM.....	112
3.3.4. Amplificação de DNA leptospírico no tecido renal.....	112
3.3.5. Árvore filogenética.....	113
3.4. DISCUSSÃO.....	115
4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
4.1. CONCLUSÕES.....	121
4.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
6. ANEXOS.....	141
6.1. DOCUMENTAÇÃO.....	143

6.1.1. Parecer do Comité Nacional de Ética (Angola).....	143
6.1.2. Modelo do Termo de Consentimento Informado.....	144
6.1.3. Formulário do Inquérito Clínico-Epidemiológico (Parte I)....	145
6.1.4. Formulário do Inquérito Clínico-Epidemiológico (Parte II)..	146
6.2. PROTOCOLOS.....	147
6.2.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica (em lâmina).....	147
6.2.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM).....	148
6.2.3. Testes de crescimento e morfologia sob diversas condições (abordagem fenotípica).....	152
6.2.4. Procedimentos para obtenção das amostras e cultura em meio seletivo de tecido renal de roedores capturados.....	154
6.2.5. Extração de DNA em amostras biológicas (soros/ tecido renal).....	157
6.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	158
6.3. ARTIGO PUBLICADO.....	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Foto de: A - Adolf Weill e B - Foto de Ryochiki Inada (esq.) e Yutaka Ido (dir.).....	6
Figura 1.2. Microfotografias de leptospiras. A - em microscópio de fundo escuro com objetiva de 40x e B - em microscopia electrónica.	11
Figura 1.3. Representação esquemática da estrutura da parede celular das leptospiras patogénicas: LPS - lipopolissacarídeos; ME - membrana externa; PG – peptidoglicano; MI - membrana interna.	13
Figura 1.4. Representação esquemática dos dois cromossomas circulares de <i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni (desenhado em escalas diferentes), apontando o tamanho dos mesmos.	18
Figura 1.5. Diagrama mostrando a distribuição de 3745 genes de <i>L. licerasiae</i> (espécie intermédia) partilhados pelas espécies <i>L. biflexa</i> (espécie saprófita) <i>L. interrogans</i> e <i>L. borgpetersenii</i> (espécies patogénicas).	19
Figura 1.6. Etapas do processo de infeção por leptospiras, mediada por moléculas da membrana externa da parede celular das leptospiras e pelos flagelos.	22
Figura 1.7. Representação esquemática do mecanismo de ligação antigénio-anticorpo (A) e da fagocitose por opsonização (B), durante a resposta humoral.	25
Figura 1.8. Ciclo de transmissão das leptospiras.	27
Figura 1.9. Três espécies de roedores comensais: A- <i>Rattus norvegicus</i> ; B - <i>Mus musculus</i> ; C - <i>R. rattus</i>	28
Figura 1.10. Mapa da distribuição mundial dos ‘casos’ de leptospirose no mundo em valores estimados.	32
Figura 1.11. Representação do mapa de África, mostrando a distribuição dos estudos realizados na Região Subsariana, a partir de 1971.	33
Figura 1.12. Observação microscópica da reação de aglutinação.; A- Microscópio de fundo escuro para visualização do teste (TAM) em placas de microtitulação. B - Imagem da aglutinação.	37
Figura 1.13. Representação esquemática do Teste de Aglutinação Macroscópica em lâmina.	38

Figura 1.14. Ilustração mostrando, a título de exemplo, os componentes de um kit de Testes de Diagnóstico Rápido (TDR) para diagnóstico de leptospirose.	38
Figura 2.1. Representação esquemática do mapa de Angola assinalando as Províncias (A e B) e Municípios onde se efetuou o estudo: 1-Luanda; 2-Cacuaco; 3-Viana, 4-Belas; 5-Huambo sede; 6-Caála; 7-Bailundo; 8-Londuimbale.	49
Figura 2.2. Representação gráfica (A e B) da distribuição da população do estudo de acordo com sexo e idade e percentagem de crianças em ambas as províncias.	60
Figura 2.3. Representação gráfica da distribuição dos pacientes por Província, segundo o grau de escolaridade.	61
Figura 2.4. Representação gráfica da distribuição dos pacientes de Luanda e do Huambo, com idades acima de 15 anos de idade ($n_{\geq 15}=283$) segundo o tipo de ocupação.	61
Figura 2.5. Representação gráfica no mapa de Angola da proporção de pacientes de acordo com a indicação da presença de ratos no domicílio ou na proximidade do mesmo em Luanda (A) e no Huambo (B).	62
Figura 2.6. Representação gráfica no mapa das duas Províncias (A – Luanda; B – Huambo) da proporção de pacientes segundo a resposta afirmativa em como “lida com animais” e as respetivas espécies.	63
Figura 2.7. Representação gráfica da percentagem dos pacientes febris inquiridos ($N=650$), segundo os principais sintomas referidos.	64
Figura 2.8. Representação gráfica da distribuição dos resultados da TAM, no total de $N=650$ soros analisados.	66
Figura 2.9. Representação gráfica da frequência dos títulos de anticorpos ($\geq 1:100$) obtidos em ($62^+/650$) amostras, com a média dos títulos segundo a idade dos pacientes.	66
Figura 2.10. Representação gráfica da distribuição dos serogrupos predominantes. A - títulos de aglutinação superiores ou iguais a 1:50 e inferiores a 1:100 (<i>borderline</i>); B - títulos iguais ou superiores a 1:100.	67
Figura 2.11. Representação gráfica no mapa das Províncias de Luanda e do Huambo, da distribuição percentual dos pacientes cujos soros foram positivos (títulos $\geq 1:100$), segundo os serogrupos identificados pela TAM. A- Luanda ($n=23^+/252$) e B-Huambo ($n=39^+/398$).	69

Figura 2.12. Representação gráfica da percentagem de soros reativos (130/650) segundo o mês da aplicação do inquérito e da recolha das amostras em ambas as Províncias (2011-2012).	71
Figura 2.13. Representação gráfica da percentagem de pacientes com soros reativos (130 ⁺ /650; 20%) segundo a faixa etária, em cada uma das Províncias (Luanda e Huambo).	72
Figura 2.14. Representação gráfica da percentagem de soros reativos de acordo com a ocupação dos pacientes (n=130 ⁺ /650).	72
Figura 3.1. Armadilhas utilizadas no estudo: A - ratoeira em guilhotina ou gancho; B - armadilha tipo <i>Tomahawk</i> [®]	88
Figura 3.2. Fotografias das etapas de identificação dos roedores capturados. A - pesagem; B - características físicas do roedor (focinho e orelhas); C - sexagem; D - medição do comprimento.	91
Figura 3.3. Etapas da obtenção das amostras nos roedores. A - inalação de éter etílico; B - incisão do abdómen; C - extração dos rins; D - punção cardíaca.	92
Figura 3.4. Incineração das carcaças e outros resíduos após colheita de material biológico: A- utilização do incinerador no Huambo; B – destruição (por queima) ao ar livre em Luanda.	92
Figura 3.5. Processo de preparação do tecido renal para a cultura em meio seletivo de EMJH: A - rins logo após a extração; B - tecido renal em saco hermético (<i>Stomacher</i> [®]); C - maceração do tecido renal; D - pipetagem do homogeneizado; E - sementeira; F- tubos com as culturas prontas para incubação (em incubadora orbital a 29°C).	94
Figura 3.6. Algumas das etapas da execução da técnica de aglutinação microscópica utilizando anticorpos monoclonais: A - diluição seriada dos soros; B - pipetagem da cultura de <i>Leptospira</i> spp; C - incubação em estufa a 37°C.	98
Figura 3.7. Etapas da preparação do tecido renal para extração de DNA leptospírico: A - Corte de fragmento; B - pesagem; C – maceração manual.	100
Figura 3.8. Teste de sensibilidade da PCR com os <i>primers</i> Hap1, utilizando-se uma cultura (serovar/estirpe) de <i>L. interrogans</i> s.l., serovar Ballum/ M127. Diluições: 1 - 10 ⁸ ; 2 - 10 ⁷ ; 3 - 10 ⁶ ; 4 - 10 ⁵ ; 5 - 10 ⁴ ; M – marcador molecular de 100-1000 pb; C- - controlo negativo; C+ - controlo positivo.	100
Figura 3.9. Vista satélite dos locais de captura dos roedores. A - Luanda: (1) São Paulo; (2) Macambira; (3) Congolenses; (4) Neves Bendinha; (5) Palanca; (6) Capolo; (7) Golf 2; (8) Talatona; (9) Camama; (10) Fubu; (11) Sapu; (12) Viana; (13) Zango; B - Huambo: (14) Calomanda; (15) Munda; (16) Benfica; (17) Baixa; (18) Capango.	102

- Figura 3.10.** Fluxograma do resultado da seleção das amostras para os distintos procedimentos laboratoriais. 103
- Figura 3.11.** Representação geográfica da distribuição das espécies de roedores capturadas nas Províncias de Luanda (A) e do Huambo (B). 105
- Figura 3.12.** Aspeto de uma cultura dos ‘novos’ isolados de *Leptospira* spp A- imagem macroscópica da cultura mostrando o “anel de Dinger”; B - imagem da cultura em microscópio de fundo escuro (objetiva 20x). 106
- Figura 3.13.** Representação gráfica dos títulos de aglutinação obtidos na reação da cultura dos ‘novos’ isolados (LDA02, LDA05, LDA10 e HBO34) com anticorpos monoclonais (mAbs), do serogrupo Ballum e Icterohaemorrhagiae. 109
- Figura 3.14.** Fotografia do gel de agarose que revela o perfil eletroforético da amplificação do DNA leptospírico a partir dos isolados: (1-2) LDA02; (3-4) LDA05; (5-6) LDA10; (7-8) HBO34; (M) marcador molecular (100-1000pb) 110
- Figura 3.15.** Resultado da PCR-iRep1: fotografia do gel de agarose com os produtos amplificados a partir de serovares de *Leptospira interrogans* s.l., da bateria de referência e dos isolados. Cada perfil corresponde a um serogrupo diferente sendo os ‘novos’ isolados (25-32) comparados com os serovares de referência. 112
- Figura 3.16.** Representação gráfica da árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene *hap1* depositadas no *GenBank*. Os pontos (•) assinalam as estirpes isoladas neste estudo. 114
- Figura 6.1.** Esquema ilustrativo da marcação das placas para distribuição dos soros problema (soros X) em diluições seriadas e do Antigénio (Ag).152

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1. Resumo das principais características diferenciais dos três géneros de espiroquetas com importância médica.	15
Quadro 6.1. Interpretação dos resultados do teste de aglutinação macroscópica em lâmina.....	148

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Lista de espécies de espiroquetas da família Leptospiraceae, incluindo os géneros <i>Leptospira</i> , <i>Tuneriella</i> e o género <i>Leptonema</i>	17
Tabela 2.1. Constituição da bateria de referência utilizada para este estudo, em uso no LLBL (IHMT).....	56
Tabela 2.2. Lista das Unidades Sanitárias selecionadas para o estudo.....	59
Tabela 2.3. Título Geométrico Médio (TGM) dos serogrupos identificados nos soros dos pacientes.	68
Tabela 2.4. Resultados dos testes de associação estatística pelo Coeficiente de Correlação de <i>Pearson</i> (r) aplicado à diferentes variáveis geográficas e ambientais, face à reatividade pela TAM.	70
Tabela 2.5. Resultados dos testes de associação estatística pelo Coeficiente de Correlação de <i>Pearson</i> (r) aplicado às variáveis clínicas face à reatividade pela TAM, no total de inquiridos (N=650).	74
Tabela 2.6. Resultados obtidos pela TAM na população do presente estudo acrescido do número de pacientes estudados em duas outras Unidades Sanitárias nas Províncias de Benguela e da Huila, em 2011 e 2014, respetivamente.....	75
Tabela 2.7. Resultados do rastreio com testes moleculares nas Províncias da Huíla e de Benguela.	76
Tabela 3.1. Características de três géneros de roedores comensais pertencentes à família Muridae, sub-família Murinae.	90
Tabela 3.2. Identificação dos roedores capturados nas duas Províncias.....	104
Tabela 3.3. Resultado dos testes fenotípicos: crescimento parcialmente inibido (+); crescimento normal (+++); S-sim (forma esférica); N-não (normal); Ictero.- Icterohaemorrhagiae.....	107

Tabela 3.4. Títulos de aglutinação obtidos com a utilização de soros hiperimunes e respetiva origem.	108
Tabela 3.5. Sumário dos resultados da análise polifásica (fenotípica e genotípica) dos isolados obtidos e respetivo número de acesso no <i>GenBank</i>	112
Tabela 6.1. Composição da bateria de serovares de referência utilizada no estudo.	150
Tabela 6.2. Material utilizado no trabalho de campo para captura, extração das amostras e cultura do tecido renal.	154
Tabela 6.3. Sequências oligonucleotídicas (<i>primers</i> A e B) usados para amplificação de DNA específico do género.	158
Tabela 6.4. Condições da PCR com os <i>primers</i> A e B.	158
Tabela 6.5. Sequências oligonucleotídicas (<i>primers</i> Hap1) usados para amplificação de DNA específico de leptospiros patogénicas.	159
Tabela 6.6. Condições da PCR com o <i>primers</i> Hap1.	159
Tabela 6.7. Sequências oligonucleotídicas (<i>Primer</i> iRep) usadas para amplificação de DNA do género <i>Leptospira</i>	160
Tabela 6.8. Condições da PCR com <i>primers</i> iRep1.	160

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

Cel. – Célula

Cf. – Confronte com/conforme

CLRs – *C-type lectin receptors*

Col. – Colaboradores

DNA – *Desoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

EMJH – *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*

FlaA – Flagelina A

FlaB – Flagelina B

“g” – Força Centrífuga ou RFC (*Relative Centrifugal Force*)

hap1 – Gene de *hemolysis-associated protein 1* (codificante da proteína associada a hemólise Hap 1)

LipL32 – Lipoproteína Lepto32

LigB – Leptospiral immunoglobulin-like protein

LLBL – Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme

LPS – Lipopolissacarídeos

Loa22 – *Leptospira* OmpA-like protein 22

mAbs – *Monoclonal Antibodies* (anticorpos monoclonais)

Mbp – *Megabase pairs* (Mega pares de bases)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

OIE – *Office International des Epizooties* / Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate Buffer Saline* (solução tampão fosfato salino)

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados ao patógeno)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PRRs – *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de padrões)

RPM – Rotações por minuto

s.l. – sensu lato

SPSS – *Statistic Package for Social Sciences* (Pacote Estatístico para Ciências Sociais)

s.s. – sensu stricto

TAM – Teste de Aglutinação Microscópica

TLR – *Toll-like receptor*

vs – *versus*

χ^2 – Qui quadrado

WHO – World Health Organization

/.../

UNIDADES DE MEDIDA

°C – Graus Celsius

g – Grama

mg – Miligrama

ml – Mililitro

μ l – Microlitro

μ m – Micrómetro

ng – Nanograma

M – Molar

1. INTRODUÇÃO/ ESTADO DA ARTE

1.1. CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

A leptospirose humana em Angola permanece sem registo nos boletins epidemiológicos e outros documentos oficiais do Ministério da Saúde do País. Já a malária, doença com quadro clínico similar, vem sendo reportada como principal causa de morbi-mortalidade na população, afetando sobretudo crianças até aos cinco anos de idade. Entretanto, os pacientes¹ com síndrome febril que chegam às Unidades Sanitárias para atendimento, são na prática submetidos a um rastreio para malária como primeira suspeita clínica e tratados como tal (COSEP *et al.*, 2011, WHO, 2013, MINSA, 2014).

Com efeito, as condições de saneamento básico no país são ainda precários assim como o fornecimento de água potável à população. Soma-se a isso o baixo grau de escolaridade (INE, 2011) o que no seu conjunto constitui risco de exposição para as doenças transmissíveis.

Paralelamente a estas constatações, a experiência profissional da autora, adquirida enquanto responsável do Programa da Malária nas Forças Armadas Angolanas de 2003 a 2010, permitiu verificar que o diagnóstico diferencial estava a ser pouco valorizado para as doenças que cursam com síndromes febris entre elas a leptospirose. Na época, dada a oportunidade de partilhar o assunto com colegas e dirigentes da Saúde através da participação em reuniões e conferências e até em debates televisivos de rede nacional (Angola) foi obtido o incentivo para elaborar o projeto do presente estudo.

Ao manifestar o interesse por esta área, foi obtida a aceitação para orientação dos trabalhos em 2006, por parte do Professor Doutor Armando Lousã² e pelo Professor Doutor David Nsalambi³ ambos Médicos Veterinários. No entanto, o início do estudo foi protelado pela demora da autorização por parte da entidade empregadora (Forças Armadas Angolanas) da autora, sabendo-se da implicação em deslocações para o exterior do país e afastamento temporário nos serviços.

¹ Foi usado o termo “pacientes” ao invés de “doentes” por ser o mais usual no país onde o estudo teve lugar

² Professor Emérito da Faculdade de Medicina Veterinária – Ex. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa-Portugal

³ Investigador Coordenador do Instituto de Investigação Veterinária, Luanda-Angola

O processo foi reativado em 2008 tendo-se levado a proposta à Professora Doutora Martha Pereira⁴ no Brasil, a qual respondeu prontamente ao pedido de um estágio de iniciação ao estudo no Laboratório de Referência na Fiocruz, Rio de Janeiro, que no entanto não chegou a concretizar-se. Enquanto isso, outra solicitação decorria no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) para candidatura à vaga no curso de Doutoramento. Esta última foi aceite com o aval da Inv.^a Doutora Maria Luísa Vieira, responsável da então Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme do referido Instituto, que se dispôs a orientar a tese. Em Abril de 2010, foi enfim obtida a autorização para se dar seguimento aos estudos.

Para Angola, a importância da investigação sobre leptospirose, deve-se não só ao pioneirismo nesta área, como também à contribuição no entendimento da importância do diagnóstico diferencial clínico-laboratorial das síndromes febris suspeitas de malária. Atraídos por estes registos, experiência de campo e impacte dos primeiros resultados do presente estudo, outros estudantes em fase inicial de construção dos seus projetos de mestrado em 2012 e em 2014, optaram por esta abordagem nas sedes de duas Províncias Lobito-Benguela e Lubango-Huíla, respetivamente.

Os referidos trabalhos que utilizaram amostras de pacientes atendidos em dois hospitais municipais, revelaram achados sobre a doença, fortalecendo desta forma os pressupostos do presente trabalho. Ainda durante este percurso, outro estudante proveniente da Guiné Bissau, foi inserido na equipa do laboratório para um mestrado desta vez ligado a roedores comensais, tendo no fim do seu projeto obtido resultados relevantes sobre leptospiras em ratos e ratazanas capturados na cidade de Bissau.

Finalmente, em Angola obteve-se a participação de profissionais médicos, médicos veterinários e técnicos de laboratório, cujo apoio foi crucial na obtenção das amostras e dos dados clínico-epidemiológicos. Destaca-se nesta participação, o Dr. Nuno Marques, médico e também estudante de doutoramento nesta Instituição (IHMT-UNL) em arboviroses, partilhou a colheita de amostras de pacientes com síndrome febril na Província do Huambo, ajudando deste modo a ampliar o tamanho da amostra populacional e a reforçar e a validar o inquérito clínico.

⁴ Pesquisadora Titular do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro- Brasil

1.2. OBJETIVOS

Objetivo 1. Conhecer a situação sero-epidemiológica em pacientes com síndrome febril suspeita de malária.

Objetivo 2. Identificar leptospiras em reservatórios silváticos

1.3. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO (leptospiras e leptospirose)

Em 1886 o médico alemão Adolf Weil (Figura 1.1.A), descreveu o quadro clínico da leptospirose caracterizado por uma síndrome icterica e disfunção renal. Apesar de terem sido encontrados registos sobre a doença atribuídos a outros autores na mesma época, o estudo de Weil obteve o devido reconhecimento e em sua homenagem esta síndrome passou a denominar-se “doença de Weil”, hoje também conhecida como leptospirose e sinónimo da apresentação severa da doença (INADA *et al.*, 1916, FAINE *et al.*, 1999, ADLER, 2015).

Mais tarde em 1907, Stimson observou leptospiras com coloração argêntica numa amostra histológica de um paciente diagnosticado clinicamente com febre amarela; as bactérias foram identificadas como *Spirochaeta interrogans*, dada a sua forma em espiral com as extremidades em forma de gancho o que lembrava um ponto de interrogação (?). A denominação foi aprovada e atualizada mais tarde com o nome de *Leptospira interrogans* por Wenyon em 1926 (SKERMAN *et al.*, 1980, ADLER, 2015).

No entanto, foram os médicos japoneses Ryokichi Inada e Yutaka Ido (Figura 1.1.B) da Faculdade de Medicina da Universidade de Kyushu em Fukuoka no Japão, que em 1913 descobriram o agente causal da “doença de Weil” e o designaram como *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. O estudo utilizou sangue de doentes, que foi inoculado em cobaios “Guinea pig” da espécie *Cavia porcellus* os quais desenvolveram a infeção. A partir dos rins destes animais foi feita a cultura e isolamento de leptospiras (INADA *et al.*, 1916, ADLER, 2015).

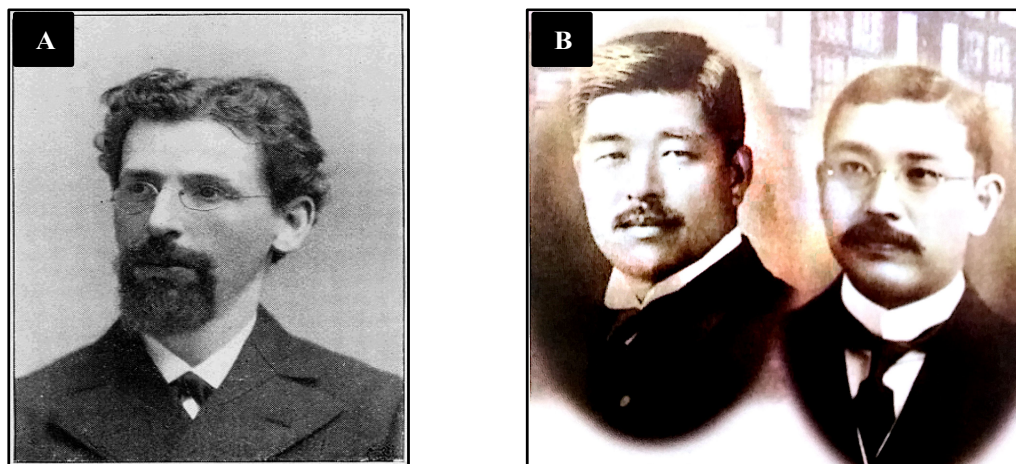


Figura 1.1. Foto de: A - Adolf Weill e B - Foto de Ryochiki Inada (esq.) e Yutaka Ido (dir.).
(Fonte: Adler 2015; fonte ILS, 2013)

Inada e Ido foram também pioneiros na descrição das principais características quer fenotípicas, quer do modo de infecção e dos próprios hospedeiros das leptospiras, conhecimentos até hoje considerados válidos, tendo obtido importantes conclusões das quais se destacam: *i)* a localização das espiroquetas em maior número no tecido intersticial dos túbulos renais, comparativamente com o fígado, intestinos e sangue de pequenos mamíferos; *ii)* a terapia eficaz baseada na administração de soros de cavalos infetados experimentalmente; *iii)* o crescimento *in vitro* das leptospiras em meio de cultura e, *iv)* a descrição dos roedores como principais reservatórios e transmissores das leptospiras (INADA *et al.*, 1916, INADA *et al.*, 1918, VIEIRA, 2006).

Os mesmos médicos japoneses (Inada e Ido) reportaram na época uma importante relação epidemiológica entre a presença de roedores e a ocorrência de leptospirose em mineiros e trabalhadores de arrozais no Japão. Além disso, conseguiram observar uma tendência sazonal da doença a favor das temperaturas mais elevadas, cerca de 22 a 25°C, o que hoje distingue as zonas endémicas de leptospirose (NOGUCHI, 1917, ADLER, 2015).

Entretanto, o estudo sobre o agente causal da doença de Weil foi continuado por Hydeo Noguchi que em 1916 propôs a denominação do género *Leptospira*, a qual foi aceite e incluída na nomenclatura até à presente data. Além deste importante contributo, Noguchi desenvolveu e publicou em 1918 outro estudo sobre leptospiras, validando a descrição anteriormente feita por Inada e Ido, desde a técnica de cultivo à

epidemiologia, tendo designado os roedores como reservatórios naturais e definido o papel dos mesmos no ciclo de transmissão (NOGUCHI, 1918, SKERMAN *et al.*, 1980).

Percebe-se que com a descoberta do agente causal, a doença ganhou importância mundial em termos epidemiológicos, estimulada pela possibilidade de confirmação laboratorial desde 1918. Assim, Alston e colaboradores, publicaram em 1937 uma descrição mais abrangente da Doença de Weil ao nível global, fruto da compilação de publicações de diferentes autores da época. Os dados descreviam aspetos clínicos, fatores de exposição da população humana, incluindo sazonalidade e tipo de ocupação, fontes de infeção e o papel de algumas espécies de roedores na transmissão de leptospiros. Consta neste documento, informação proveniente de estudos realizados em alguns países Africanos como Marrocos e ex Congo Belga, entre os registos coligidos pelos referidos autores (ALSTON AND BROWN, 1937).

Ainda a propósito do continente Africano, foram mencionados por Tersptra, (1992) registos clínicos da leptospirose que remontam a 1912 no Egipto. Segundo o mesmo autor, em 1920 no Senegal foram detetadas espiroquetas em tecido renal de um paciente humano (TERPSTRA, 1992). O conjunto destes estudos mencionados por Tersptra, mostra dois conjuntos de países que se destacaram em épocas distintas. Assim, até à década de 60 destacaram-se os estudos realizados nas ex-colónias da França e da Bélgica tais como Côte d'Ivoire, Congo Brazzavile, Congo Kinshasa e Marrocos; nas décadas seguintes, foram publicados registos sobre leptospirose em países de expressão anglo-saxónica, entre eles África do Sul, Kenya e Zimbabwe

Já nos países Africanos de expressão portuguesa, os primeiros estudos encontrados sobre leptospirose são nomeadamente: em Moçambique, realizados por Atalaia, 1966 (ATALAIA, 1966), Cabo-Verde em 1989 por Sebek (SEBEK *et al.*, 1989), seguindo-se Angola em 1991, através do Médico Veterinário Francisco Baptista (BAPTISTA, 1991).

Em Portugal, que até 1975 possuía colónias em África entre elas Angola, Fraga de Azevedo, respeitado Médico e investigador no então “Ultramar”, com a sua equipa, publicaram em 1943 um dos primeiros estudos sobre leptospirose neste país (AZEVEDO AND SILVA, 1943). No entanto, os estudos mais consolidados sobre a leptospirose humana em Portugal viriam a surgir nos anos 80 e seguintes, já depois da

descolonização, pela investigadora Margarida Collares-Pereira e a sua equipa. O grupo estudou, em particular, a leptospirose na Região Autónoma dos Açores que a partir de então foi identificada como região endémica da doença no país (VIEIRA, 2006).

Nos animais, apesar de já terem sido reportadas manifestações clínicas idênticas à “doença de Weil”, no início do século, só décadas depois foram diagnosticadas como tal. Ao longo dos anos foram também conhecidas formas pouco comuns da doença dada a diversidade de espécies animais e dos diferentes tipos de resposta das mesmas. Entretanto, o interesse veterinário pela leptospirose teve o seu grande incremento a partir de 1950 após ter sido reconhecida como a doença “*major*” no gado bovino por provocar um impacto económico negativo na pecuária (VIEIRA, 2006).

No entanto, o controlo da doença bem como as políticas de saúde em relação à leptospirose ao nível internacional, tiveram destaque nos anos 50 através dos trabalhos da então recém-fundada Organização Mundial da Saúde (WHO, 1952). Em 1960 junto com a Organização Internacional de Epizootias (OIE) a leptospirose foi classificada como zoonose e passou a ser alvo de controlo integrado (FAINE *et al.*, 1999).

Mais tarde já nos anos 90, os trabalhos de leptospirologos também membros do Comité de Taxonomia, liderado por cientistas da área, culminaram com a fundação em 1994 da *International Leptospirosis Society* (ILS), objetivando o estabelecimento de uma rede colaborativa de cientistas bem como o fomento da investigação sobre leptospirose no mundo (FAINE *et al.*, 1999). Dois anos depois, realizou-se o primeiro Congresso em Nantes (França) propondo-se a uma periodicidade bi-anual. Em 1999, a ILS publicou através da OMS os primeiros dados epidemiológicos da leptospirose humana ao nível mundial, fazendo referência ao número de casos por género e faixa etária, animais hospedeiros e serogrupos mais comuns em cada país (WHO, 1999).

Nos últimos anos, registou-se outro marco histórico desta vez em termos técnico-científicos. Tratou-se do advento da biologia molecular iniciado nos anos 80, que veio revolucionar o conhecimento sobre a estrutura genómica e funcional dos microrganismos. Neste âmbito, no princípio deste século, Ren e col. (REN *et al.*, 2003) e Nascimento e col., (NASCIMENTO *et al.*, 2004) realizaram pela primeira vez, a descodificação completa do genoma de dois serovares do género *Leptospira*. Utilizaram para tal, dois “modelos” (serovares) de *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.), na

China, o serovar Lai e, no Brasil o serovar Copenhageni. O trabalho da equipa brasileira foi mais adiante comparando características genómicas dos dois serovares, além de descrever a estrutura funcional das proteínas da membrana externa das leptospiras nomeadamente, a proteína LipL32 e a proteína Loa22, proteínas de superfície importantes na patogénese das leptospiras. Este feito impulsionou importantes abordagens nas investigações em curso, tais como o entendimento dos mecanismos da resposta humoral, além da patogénese e virulência destas espiroquetas (KO *et al.*, 2009).

Em Portugal, país onde se desenvolveu parte do presente estudo e a par dos trabalhos de investigação levados a cabo por Collares-Pereira M., e por Vieira ML., no Laboratório de Referência de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL) sediado no IHMT, UNL, Paiva-Cardoso M., publicou em 2013 a descrição de um novo serovar isolado pela primeira vez em Portugal, denominado serovar Altodouro (*L. kirschneri*), o que contribuiu para reforçar o conhecimento sobre a diversidade de serovares nas diferentes áreas geográficas (PAIVA-CARDOSO *et al.*, 2013).

De acordo com Ben Adler (2015), um dos mais conceituados leptospirologos contemporâneos, a tendência nos últimos 10 anos, aponta para o ressurgimento da atividade de investigação sobre as espécies de *Leptospira* e da leptospirose, constatando-se uma subida exponencial de publicações nesta área, cerca do dobro comparado aos primeiros 50 anos após a descoberta do referido agente etiológico. Vale aqui referir os significativos avanços que têm sido registados em termos taxonómicos com a identificação de novas espécies genómicas, devido à utilização de técnicas moleculares inovadoras (SMYTHE *et al.*, 2013).

Atualmente, estudos sobre o género *Leptospira* e sobre leptospirose, sugerem algumas linhas de tendência que abaixo se elencam de acordo com as conclusões extraídas de um dos últimos encontros científicos da ILS (*8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society*) decorrido no ano de 2013 em Fukuoka no Japão em homenagem ao centenário da descoberta do agente etiológico da leptospirose:

a) salienta-se o progresso ao nível molecular dos mecanismos imunopatogénicos e de virulência, estrutura e funções da espécie *L. interrogans* s.l.;

b) é dada muita importância à optimização dos métodos biotecnológicos no diagnóstico da leptospirose, sem no entanto se descuidar os métodos tradicionais de deteção, identificação e classificação das leptospirosas;

c) existe a necessidade de se prosseguir com a investigação que objetiva uma vacina estável e eficaz para a população humana, sobretudo em países e/ou regiões onde a doença é mais prevalente e constitui problema de saúde pública;

d) estão a ser desenvolvidos esforços cada vez mais notórios para a cobertura universal da vigilância epidemiológica através da criação de grupos de trabalho estabelecidos, fruto do conjunto de ações da OMS, *Food and Agriculture Organization* - FAO e da *World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties)* - OIE, tais como a já desenvolvida *Leptospirosis Epidemiology Reference Group* (LERG) cujo primeiro encontro se realizou em dezembro de 2009;

e) por último, assiste-se agora também ao desdobramento da ILS em grupos regionais de que já é exemplo a *European Leptospirosis Society* (ELS) fundada em 2013, estrutura que reforça e estimula a investigação e a vigilância da leptospirose como doença re-emergente na Europa (ILS, 2013);

1.4. BACTERIOLOGIA

1.4.1. Morfologia

As leptospiras são bactérias longas, muito finas, helicoidais e bastante móveis, visíveis somente em microscopia de fundo escuro (Figura 1.2A); possuem um comprimento de cerca de 6-20 μm e um diâmetro que varia de 0,1 a 0,2 μm ; formam espiras curtas e regulares e possuem as extremidades em gancho (Figura 1.2B); possuem uma motilidade muito particular com movimentos de rotação, translação e direcional devido a contração e distensão de um flagelo axial situado ao longo do espaço periplasmático (FAINE *et al.*, 1999, LEVETT, 2001).

Este flagelo presente em todas as espiroquetas, é composto por proteínas (flagelina), glúcidos e lípidos (MARTINHO AND TAVEIRA, 2014). A referida motilidade tem um papel na patogênese relativamente à progressão das leptospiras nos tecidos dos hospedeiros (EVANGELISTA AND COBURN, 2010).

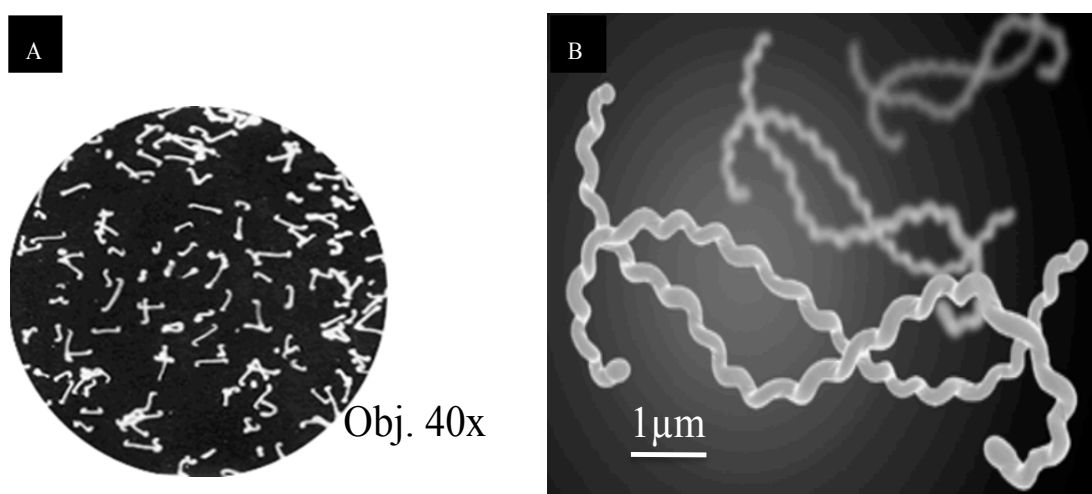


Figura 1.2. Microfotografias de leptospiras. A - em microscópio de fundo escuro com objetiva de 40x e B - em microscopia electrónica.

(Fonte: Vieira, 2006)

Algumas destas características morfológicas típicas das espiroquetas do género *Leptospira* tais como o tipo de flagelo e as extremidades em gancho, foram descritas por Ritchie e Ellinghausen (1965) ao observar ao microscópio electrónico a ultra estrutura celular destas bactérias, tendo usado como modelo o serovar Pomona de *L. interrogans* s.l.

1.4.2. Nutrição, metabolismo e crescimento

As bactérias do género *Leptospira* são aeróbias obrigatórias, com maior sobrevivência em meios alcalinos, podendo permanecer no ambiente (solo e/ou água) por períodos relativamente longos preferencialmente em climas quentes e húmidos.

A nutrição destas bactérias requer fontes proteicas ou azotadas de onde retiram alguns compostos essenciais tais como a amónia e a albumina. Igualmente necessitam de ácidos gordos de cadeia longa, dióxido de carbono (CO₂), cianocobalamina, biotina, magnésio, sulfato e ferro e/ou o heme da hemoglobina. Na prática, o cultivo das leptospiras requer, alguns componentes essenciais para seu o crescimento tais como o polissorbato, soro de coelho, albumina de soro bovino e alguns fosfatos (FAINE *et al.*, 1999).

Por outro lado, as leptospiras são capazes de sintetizar um grande número de compostos químicos necessários à sua nutrição, à colonização e à destruição de determinados tecidos do hospedeiro. Dos referidos compostos destaca-se a hemolisina que destrói o endotélio dos pequenos vasos no hospedeiro causando-lhe uma cadeia de distúrbios na coagulação, ocasionando por vezes quadros hemorrágicos (LEE *et al.*, 2000).

O grupo de investigadores Nascimento e col. (2004) aquando da descodificação do genoma das leptospiras, identificaram os genes responsáveis pela síntese da peroxidase e dos ácidos triglicérideos, respetivamente, presentes na parede celular e na membrana externa destas bactérias. A Figura 1.3 mostra a estrutura onde ocorrem os principais mecanismos mencionados.

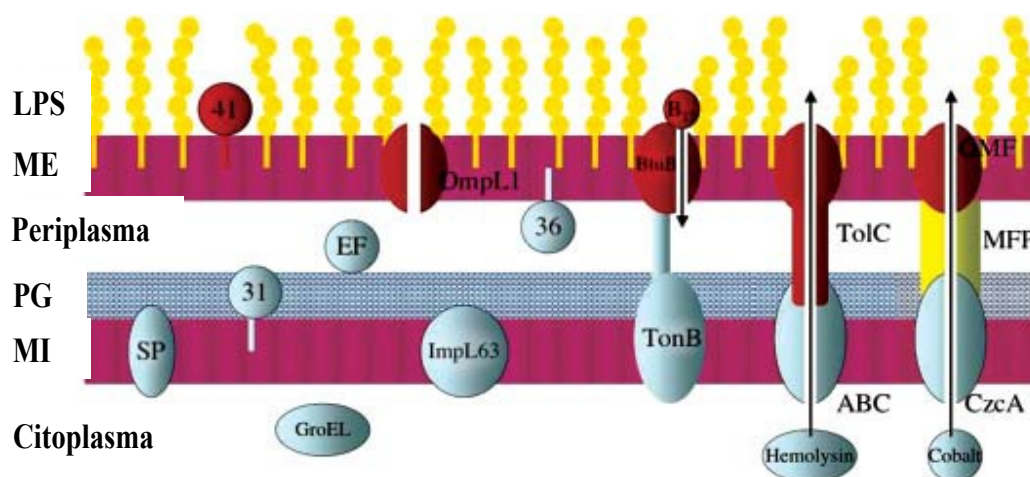


Figura 1.3. Representação esquemática da estrutura da parede celular das leptospiros patogênicas: LPS - lipopolissacarídeos; ME - membrana externa; PG - peptidoglicano; MI - membrana interna.

(Fonte: Nascimento et al, 2004)

O crescimento ou multiplicação das leptospiros ocorre por fissão binária transversal como na grande maioria das bactérias (RITCHIE AND ELLINGHAUSEN, 1965), podendo atingir a concentração de 10^8 células/ml nos órgãos do hospedeiro, tal como se constata em testes diretos nomeadamente o exame da cultura.

1.4.3. Cultura e isolamento

A obtenção e a manutenção de culturas puras de leptospiros, constituem um processo fastidioso pelo tempo que demora e pelo risco de contaminação. Para o seu crescimento, necessitam de temperaturas de incubação de 29 a 30°C (ELLINGHAUSEN, 1973) e, dada a sensibilidade das leptospiros à presença de luz, as culturas devem ser incubadas em ambiente escuro; todavia sendo aeróbias, crescem melhor agitando-se os tubos de cultura regularmente. O meio de cultura mais utilizado na rotina laboratorial é o meio de Ellingausen-MacCollough, modificado por Jhonson e Harris, denominado meio EMJH, podendo ser utilizado na forma líquida ou semissólida, dependendo da finalidade (POSTIC et al., 2000, WHO, 2003, CASTRO et al., 2014).

A espécie patogénica *L. interrogans* s.l., ao contrário da espécie saprófita *L. biflexa* s.l., exige condições mais estritas para o seu crescimento. Jhonson & Rogers (1964) e Jhonson & Harris (1967), descreveram padrões de crescimento distintos para leptospiros patogénicas e saprófitas pela alteração das condições químicas do meio e da temperatura, respetivamente. Estes autores concluíram que a espécie *L. interrogans* s.l., tem o crescimento inibido quando mantidas à temperatura de 13°C e o mesmo acontece na presença de 8-azaguanina (225µg/ml), composto que afeta componentes cromossómicos das leptospiros patogénicas.

Para além dos testes mencionados, foi mais tarde demonstrado por Auran e col., (1972) que adicionada uma solução 1 M de NaCl ao meio de cultura, as leptospiros patogénicas sofriam alterações morfológicas adquirindo uma forma esférica, após duas horas de incubação.

Nas culturas primárias destinadas a isolar a bactéria a partir de amostras biológicas, é geralmente utilizado o meio EMJH semissólido (com adição de ágar) e prolonga-se o período de incubação de cinco dias para três a quatro semanas. É requerido um meio de EMJH seletivo contendo inibidores de crescimento da flora oportunista com a utilização de 5-fluorouracil (citostático) além de antibióticos como a fosfomicina, o que não afeta o crescimento das leptospiros devido à sua resistência às bases purínicas incorporadas nestes fármacos (POSTIC *et al.*, 2000).

1.4.4. Taxonomia e classificação

As bactérias do género *Leptospira* [descrita por Noguchi H., 1917] pertencem à família Leptospiraceae [Hovind-Hougen K., 1978], classe Spirochaetae [Cavalier Smith, 2002] e à Ordem Spirochaetales [Buchanan, 1917]. A mesma ordem (Spirochaetales) inclui também a família Spirochaetaceae [Swellengrebel, 1907], que por sua vez comporta dois géneros de espiroquetas com importância médica: o Género *Treponema* cuja espécie *T. pallium* é o agente etiológico da sífilis e o género *Borrelia* que inclui o complexo *B. burgdorferi* s.l., agente etiológico da borreliose de Lyme, (SKERMAN *et al.*, 1980) cujas principais diferenças são mostradas no Quadro 1.1.

Quadro 1.1. Resumo das principais características diferenciais dos três géneros de espiroquetas com importância médica.

(Adaptado de Vieira, 2006)

Género	<i>Leptospira</i>	<i>Treponema</i>	<i>Borrelia</i>
Morfologia	Espiras finas e acentuadas	6 a 14 espiras regulares	4 a 8 espiras ténues
Comprimento	6-20µm	5-20µm	3-20µm
Diâmetro celular	0,1-0,15µm	0,1-0,5µm	0,1-0,5µm
Flagelo periplasmático	2	6 a 10	15-20
Discos de inserção	3 a 5	1	2
Peptídeoglicano (constituição)	Ácido Diaminopimérico	Ornitina	Ornitina
Metabolismo	Aeróbio	Anaeróbio	Microaerofílico
Produção de catalase	Presente	Ausente	Ausente
Fonte de Energia	Ácidos gordos de cadeia longa	Carboidratos e/ou aminoácidos	Carboidratos
Transmissão por artrópodes	Não	Não	Sim
Enfermidade causada	Leptospirose	Sífilis	Borreliose de Lyme; Febre recorrente

1.4.5. Classificação fenotípica (convencional)

Pela nomenclatura convencional, o género *Leptospira*, divide-se em dois grupos de espécies distintas: o complexo *L. interrogans* s.l., constituído pelos serovares patogénicos e o complexo *L. biflexa* s.l., constituído por serovares saprófitos (LEVETT, 2001, CERQUEIRA AND PICARDEAU, 2009).

Com base nas afinidades serológicas, o género *Leptospira* é constituído por serovares, agrupados por sua vez em serogrupos. A identificação é possível aplicando diversos métodos, sendo o mais usual aquele que utiliza uma reação de aglutinação microscópica com anticorpos monoclonais (*monoclonal Antibodies*- mAbs) e em laboratórios mais especializados, o método de “Aglutinação por Absorção Cruzada com Antígenos Homólogos” (*Cross Agglutination Absortion Test* - CAAT) (KMETY AND DIKKEN, 1993).

Estas técnicas têm permitido identificar novos serovares e atualmente são conhecidos já cerca de 300 serovares patogénicos incluídos em 25 serogrupos, dando um importante suporte ao conhecimento da relação epidemiológica entre a fonte de infeção, a espécie do hospedeiro e o conseqüente risco de contrair a infeção grave em determinadas regiões (LEVETT, 2001).

Entretanto, a nomenclatura de serovar sofreu uma alteração de modo a não confundir-se com nomes de serotipos de *Salmonella* spp. Em 2002 o *Subcommittee on the Taxonomy of Leptospiraceae*, aprovou a escrita do nome do serovar no formato de escrita normal (inicialmente em itálico) com inicial maiúscula (antes minúscula) assim como a forma de mencionar o serovar depois da espécie, devendo então escrever-se como se exemplifica: *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* (LEVETT, 2006), esta é assim, a nomenclatura recomendada ainda na atualidade.

1.4.6. Classificação genotípica

A atual classificação das espécies de *Leptospira*, é definida em termos genómicos por *genospecies*. Esta identificação iniciou-se nos anos 80, através de complexos estudos com técnicas moleculares de hibridização DNA-DNA que permitiram agrupar microrganismos do género *Leptospira* através da comparação de sequências de bases nucleotídicas, admitindo-se uma homologia superior a 75% e uma divergência inferior a 5% entre eles (FAINE *et al.*, 1999).

Em termos filogenéticos, as leptospirosas formam três *clusters* que incluem as espécies patogénicas, as intermédias e as não patogénicas (saprófitas). Até a data (2015) estavam descritas vinte e uma (21) *genospecies* como representado na Tabela 1.1 (LEVETT, 2015).

Tabela 1.1. Lista de espécies de espiroquetas da família Leptospiraceae, incluindo os géneros *Leptospira*, *Turneriella* e *Leptonema*.

(Adaptado de Levett, PN, 2015)

Espécies	Publicação válida
<i>L. alexanderi</i>	Brenner et al. (1999)
<i>L. alstonii</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. biflexa</i>	Faine and Stallman (1982)
<i>L. borgpetersenii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. broomii</i>	Levett et al. (2006)
<i>L. fanei</i>	Pérolat et al. (1998)
<i>L. inadai</i>	Faine and Stallman (1982)
<i>L. idonii</i>	Saito et al. (2013)
<i>L. interrogans</i>	Faine and Stallman (1982)
<i>L. kirshneri</i>	Ramadas et al. (1992)
<i>L. kmetyi</i>	Slack et al. (2009b)
<i>L. licerasiae</i>	Matthias et al (2008)
<i>L. meyery</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. noguchii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. santarosai</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. terpstrae</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. vanthielii</i>	Smythe et al. (2013)
<i>L. weilii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. wolbachii</i>	Yasuda et al. (1987)
<i>L. wolffii</i>	Slack et al. (2008)
<i>L. yanagawae</i>	Smythe et al. (2013)
<i>Turneriella parva</i>	Levett et al. (2005)
<i>Leptonema illini</i>	Hovind-Hougen (1979)

1.5. BIOLOGIA MOLECULAR

1.5.1. Estudos do genoma do género *Leptospira*

A compreensão prática das bases genéticas do género *Leptospira* foi iniciada com estudos focados na sequenciação de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e de DNA ribossómico pertencentes à estrutura cromossómica. Finalmente, em 2003 e em 2004, foram feitas as primeiras sequenciações do genoma do género *Leptospira*, que como referido anteriormente, constituíram um marco histórico e revolucionário no estudo deste agente microbiano já que permitiram a identificação de genes que codificam proteínas ligadas a fatores de patogenicidade e de virulência destas bactérias (PICARDEAU, 2015).

Efetivamente, os estudos das equipas de investigadores Ren e col. (2003) e Nascimento e col. (2004) permitiram pouco depois, comparar o genoma de dois serovares distintos de *L. interrogans* s.l., o serovar Copenhageni e o serovar Lai, em termos de número de genes e tamanho assim com a confirmação da forma circular dos respetivos cromossomas (NASCIMENTO *et al.*, 2004). A Figura 1.4, mostra os dois cromossomas de *L. interrogans* serovar Copenhageni para exemplificar a estrutura genética das leptospiras patogénicas.

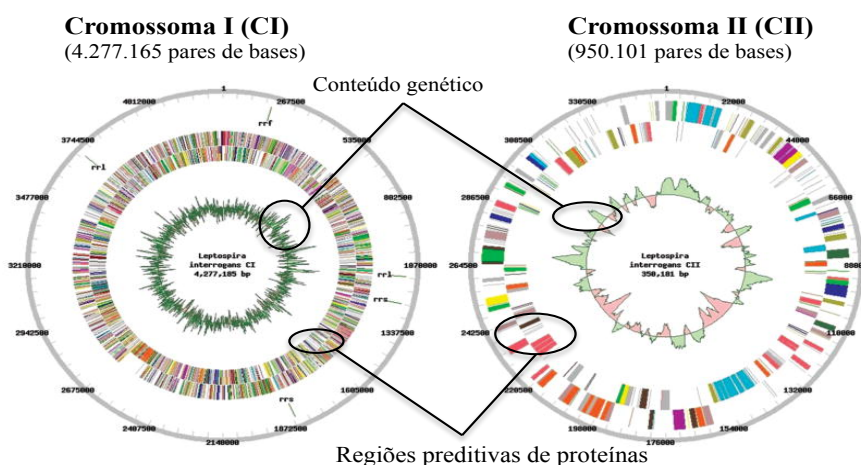


Figura 1.4. Representação esquemática dos dois cromossomas circulares de *L. interrogans* serovar Copenhageni (desenhado em escalas diferentes), apontando o tamanho dos mesmos.

(Adaptado de Nascimento e col., 2004)

Subsequentes abordagens foram já realizadas no campo da proteómica e da genómica das leptospiros, favorecendo a comparação e o enquadramento filogenético em relação a outros agentes já conhecidos. Assim, Bulach e col. (2006), concluíram a sequenciação do genoma da espécie *L. borgpetersenii*, acrescentando esse conhecimento a uma lista de achados que identificam as leptospiros patogénicas (BULACH *et al.*, 2006)

Deste modo, em 2008, foi sequenciado o genoma da espécie saprófita *L. biflexa* s.l., pela equipa francesa liderada pelo investigador Picardeau. Este estudo revelou genes específicos não encontrados nos cromossomas de genoespécies patogénicas (*L. interrogans* e *L. borgpetersenii*), dado que enfatiza a diferença das espécies quanto a fatores ligados à patogenicidade, muitos deles já revelados em estudos anteriores (PICARDEAU *et al.*, 2008).

Seguiu-se a sequenciação do genoma da espécie *L. licerasiae*, concluída em 2012 pela investigadora Ricaldi e col, que além de confirmar a posição intermédia da referida espécie, entre as patogénicas e saprófitas, forneceu um contributo sobre as características genéticas dos três grupos filogenéticos (Figura 1.5) identificando o número de genes partilhados entres elas (RICALDI *et al.*, 2012).

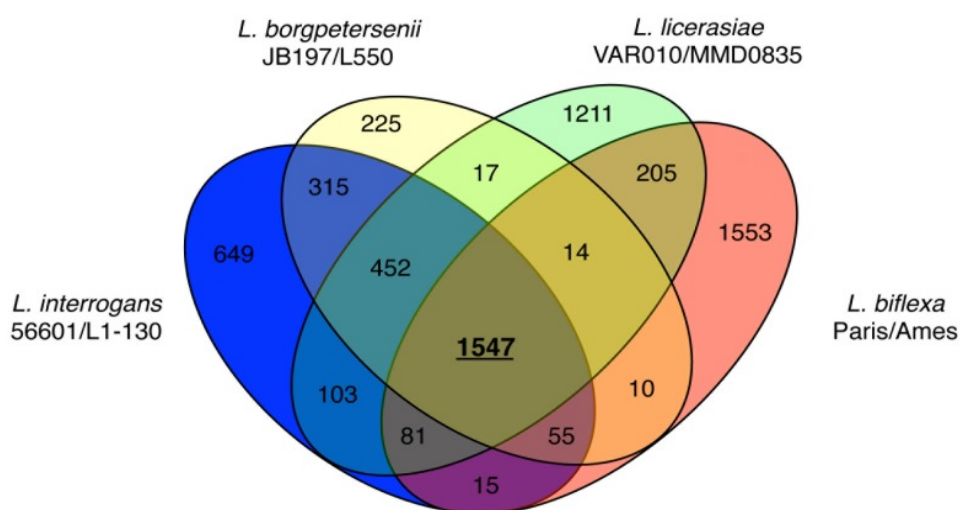


Figura 1.5. Diagrama mostrando a distribuição de 3745 genes de *L. licerasiae* (espécie intermédia) partilhado pelas espécies *L. biflexa* (espécie saprófita) *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (espécies patogénicas).

(Fonte: Ricaldi e col. 2012 doi:10.1371/journal.pntd.0001853.g003)

Segundo Picardeau (2015), o estudo do genoma do género *Leptospira*, cujo tamanho é maior comparado ao genoma de outras espiroquetas, tais como por exemplo as espécies do género *Treponema*, explorou apenas uma pequena parte das características dos genes. No entanto, abriu novas abordagens para o conhecimento sobre fatores evolutivos, regulatórios e mutagénicos a serem estudados no futuro em conjunto com as características de elementos extra cromossómicos, desconhecidos até a data.

1.5.2. Bases moleculares da patogénese das leptospiras

Os métodos de biologia molecular têm permitido a identificação das proteínas responsáveis pela resposta imune do hospedeiro, assim como a caracterizar os genes que as codificam. No entanto, as bases moleculares da patogénese das leptospiras continuam ainda pouco conhecidas.

Dada a distância filogenética com outras bactérias patogénicas, verificou-se que os fatores de virulência das leptospiras são distintos. Isto indica que as leptospiras tem novos mecanismos de virulência, uma noção suportada pela lista de achados no grupo de genes específicos das leptospiras patogénicas. Os estudos de fatores de mutação genética nas sequências disponíveis (já conhecidas) do genoma, mostram igualmente fatores de virulência acrescentados nas referidas bactérias comparativamente a outras espécies. Neste contexto, as proteínas de superfície específicas assim como características fenotípicas como a motilidade, expressam um papel importante como determinante da doença no hospedeiro (MURRAY, 2015).

O progresso das técnicas de biologia molecular com o suporte de ferramentas bioinformáticas têm ajudado a perceber melhor os resultados de técnicas moleculares mais elaboradas, de que são exemplo a restrição de polimorfismos de endonucleases do DNA leptospírico, como a *Variable Number Tandem Repeat* - VNTR e *Multilocus Sequence Typing* – MLST, as quais possibilitam a identificação mais precisa de novas genospecies (KO *et al.*, 2009).

A informação armazenada em bibliotecas virtuais de genes permitem assim identificar as genospecies por homologia DNA-DNA a partir de uma sequência de bases nucleotídicas (NCBI, 2013).

Com base nos estudos de Ren e col., (2003) e de Nascimento e col., (2004), sobre proteínas de superfície responsáveis pela virulência, Murray (2015) descreveu o mecanismo destes componentes da membrana externa das leptospiros de acordo com os aspectos clínicos manifestados pelo hospedeiro representado na Figura 1.6, dos quais se destacam:

- motilidade desenvolvida pelo flagelo que contém as proteínas FlaA e FlaB (codificadas respectivamente pelos genes com o mesmo nome, *flaA* e *flaB*). Sabe-se também que os genes mutantes podem atenuar a ação de células fagocitárias;
- quimiotaxia ativada por genes *CheB* e *CheX*. revelaram-se responsáveis pelo tropismo por determinados tecidos, em particular pelos túbulos renais que são os mais comumente colonizados;
- capacidade de atravessar os tecidos através da ação de enzimas específicas;
- capacidade de adesão na matriz extracelular ou nos tecidos do hospedeiro;
- proteínas de múltipla ligação, entre elas a LipL32 também denominada Hap1, lipoproteína dominante da membrana externa da parede celular das leptospiros;
- mecanismos de invasão interagindo com a imunidade do hospedeiro;
- aquisição de nutrientes como a heme dos eritrócitos, favorecida pela Lip41;
- mecanismos de destruição dos tecidos por enzimas (*sphingomyelinases*) que provocam a lise celular no endotélio.

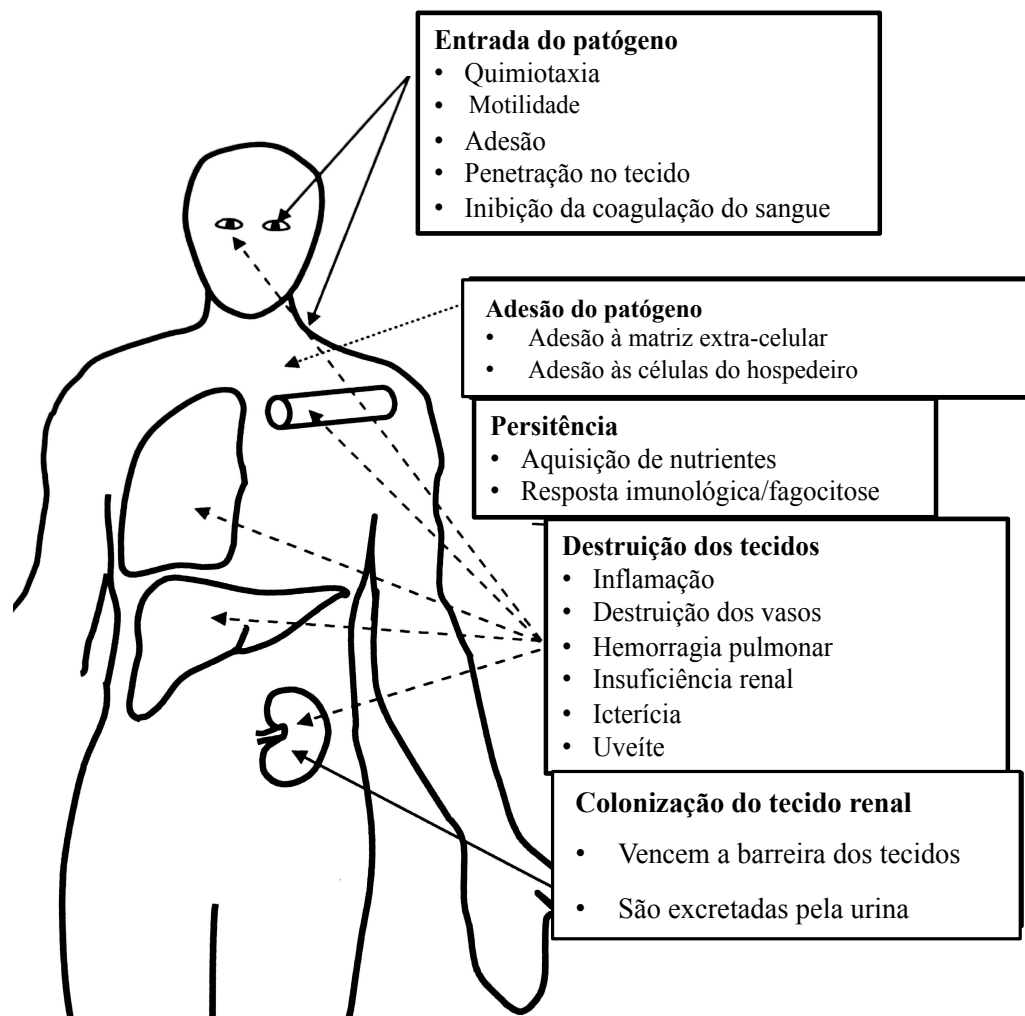


Figura 1.6. Etapas do processo de infecção por leptospiras, mediado por moléculas da membrana externa da parede celular das leptospiras e pelos flagelos.

(Adaptado de Murray GL, 2015)

1.6. PATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

1.6.1. Interação leptospiras/hospedeiro

O processo de infecção mais comum, é aquele que se inicia com a invasão dos agentes bacterianos (leptospiras) no organismo através da pele lacerada ou escoriada e/ou das mucosas (conjuntivais, orais e vaginais). Na fase seguinte, as leptospiras atingem a corrente sanguínea e instalam-se no interstício celular do parênquima dos órgãos de eleição tais como os rins, o fígado ou pulmões. O período de incubação desde a fase de exposição ao início dos primeiros sintomas da leptospirose situa-se entre sete (7) a 12 dias e no limite, de três dias a um mês (LEVETT, 2001, HAAKE AND LEVETT, 2015).

Após multiplicarem-se, as bactérias desencadeiam os mecanismos patogênicos produzindo quadros que variam de assintomáticos até quadros clinicamente complicados, que podem evoluir até formas graves tais como, a síndrome hepática, o quadro hemorrágico e a síndrome renal, incluindo IRA (insuficiência renal aguda), podendo culminar com falência multiorgânica e óbito (ZUERNER, 2015).

Não obstante tratem-se de bactérias patogênicas, a ocorrência de uma infecção tem em conta a expressão dos mecanismos de patogenicidade e de virulência das leptospiras no organismo determinada tanto pelas características genéticas como pela resposta humoral do hospedeiro. Nos animais cuja resposta imune é muito baixa como no caso dos roedores, as leptospiras tendem a colonizar os seus órgãos preferencialmente os rins onde encontram condições propícias ao seu crescimento sem causar qualquer dano no hospedeiro ao longo da sua vida o que faz destes pequenos mamíferos, reservatórios por excelência (ADLER AND FAINE, 1977, FAINE *et al.*, 1999).

Entretanto, apesar dos rins serem os órgãos alvo da infecção por leptospiras, são largamente reportados os casos de leptospirose com comprometimento pulmonar, que segundo Truong e Coburn (2012) são devidos a: *i*) surgimento de novas estirpes bacterianas; *ii*) aquisição de novas características de virulência em estirpes nas regiões

endémicas ou até, *iii*) do reconhecimento da síndrome por parte da comunidade Médica e Veterinária (TRUONG AND COBURN, 2011).

No sangue, a presença de leptospiros verifica-se apenas na fase aguda da doença aproximadamente nas duas primeiras semanas comparativamente à fase de convalescência, facto comprovado pela diferença na sensibilidade e especificidade aquando da aplicação dos métodos diretos de diagnóstico laboratorial (POSTIC *et al.*, 2000).

1.6.2. Mecanismos da resposta imunológica vs formação de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l.

Após o rompimento das barreiras físicas no hospedeiro (pele e/ou mucosas), incluindo enzimas e triglicerídeos nelas contidos, a presença de leptospiros provoca uma cadeia de mecanismos de defesa imunológica com a ativação do sistema humoral e celular de combate à infeção.

Durante a resposta inata do hospedeiro, os receptores designados *pattern recognition receptors* - PRRs, reconhecem e interagem com os padrões moleculares associados ao patógeno (*pathogen-associated molecular patterns*- PAMPs). Nas leptospiros, tal como em outras bactérias Gram negativas, os PAMPs incluem uma variedade de moléculas encontradas nas proteínas de superfície da membrana celular (Figura 1.3) tais como os lipopolissacarídeos - LPS, lipoproteínas entre elas a LipL32 e a LigB, peptidoglicano e proteínas do flagelo (FlaA; FlaB). Enquanto que no hospedeiro, as PRRs incluem os *toll-like receptors*-TLR e *C-type lectin receptors*-CLRs além de outros receptores celulares que no seu conjunto produzem sinais que induzem a resposta celular. Na sequência, o ‘sistema complemento’ entra em ação, mediado pelas citocinas, produzindo a resposta inflamatória o que permite a concentração e a ação de células fagocitárias contra o agente infeccioso (APPELBERG, 2014, MURRAY, 2015, ZUERNER, 2015).

Segue-se a resposta adaptativa do hospedeiro à infeção por leptospiros que é basicamente determinada por anticorpos, cuja especificidade é relacionada a um mesmo antigénio aglutinante que determina o tipo sorológico ou serovar. Os anticorpos

desenvolvem-se geralmente a partir do segundo dia até cerca do 10º dia de infecção dependendo do serovar ou estirpe de *L. interrogans* s.l., envolvida e da imunocompetência do hospedeiro (humano ou animal) ou ainda da carga bacteriana dos mesmos agentes (FAINE *et al.*, 1999, MURPHY, 2012).

A produção de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., mais propriamente das imunoglobulinas (Ig) do tipo M e do tipo G, derivam da ativação dos linfócitos B através da transmissão de sinais da presença do antígeno quando a infecção não é debelada pela resposta inata do hospedeiro. As células B (geradas na medula óssea) reconhecem os antígenos por ligações a locais designados epítomos situados numa determinada região da membrana (LPS) da célula bacteriana e acessíveis aos anticorpos como mostra a Figura 1.7A, (VILANOVA, 2014).

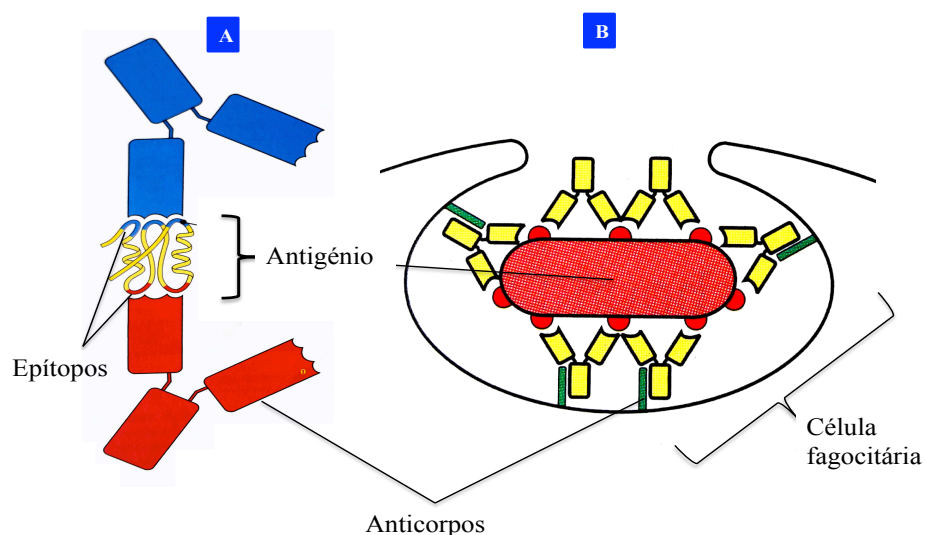


Figura 1.7. Representação esquemática do mecanismo de ligação antígeno-anticorpo (A) e da fagocitose por opsonização (B), durante a resposta humoral.

(Adaptado de Murphy, 2012)

Por sua vez a ligação dos anticorpos ao antígeno provoca a formação de aglutininas que promovem a opsonização, mecanismo que favorece o reconhecimento pelas células fagocitárias e a consequente fagocitose e lise das bactérias (Figura1.7B).

Devido à forma faseada de ativação dos mecanismos de produção de anticorpos, observa-se na fase inicial da infecção a proliferação das IgM enquanto que na fase tardia há produção das moléculas de IgG (MURPHY, 2012, ZUERNER, 2015).

1.7. EPIDEMIOLOGIA

1.7.1. Fonte de infecção e transmissão

A principal forma de infecção por leptospiras quer para humanos quer para animais, é o contacto direto ou indireto com a urina contaminada de um animal infectado ou colonizado por leptospiras (Figura 1.8), sendo os roedores os principais responsáveis por essa transmissão (INADA *et al.*, 1916, COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2000). As leptospiras colonizam assim, os túbulos renais dos animais e são expelidas através da urina para o ambiente onde sobrevivem em solos húmidos e alcalinos (NOGUCHI, 1918). O investigadores Rosseti e col. (2004), verificaram em lâminas histológicas de rins de roedores, a presença abundante de leptospiras no lúmen dos túbulos renais comparativamente ao córtex, reforçando o conhecimento sobre a localização preferencial das leptospiras naqueles órgãos (ROSSETI *et al.*, 2004).

Nas diferentes espécies animais em geral, a transmissão direta é pouco comum, ocorrendo por via genital ou contacto direto com os fluidos corporais contendo leptospiras viáveis (WHO, 2003). Porém, no caso de bovinos, a transmissão vertical ou de ‘mãe para cria’ é comprovada pela associação com a infecção neonatal, aborto e baixo peso ao nascer (FAINE *et al.*, 1999).

O gado bovino é das espécies mais sensíveis à infecção leptospírica cujas consequências são relevantes dada a sua importância económica nos países em desenvolvimento (ELLIS, 2015). No Zimbabwe, por exemplo, foram altas as taxas de infecção detetadas em tecidos de órgãos de eleição destes animais (rins) em amplos estudos feitos durante o abate (FERESU, 1992, FERESU *et al.*, 1993, FERESU *et al.*, 1994, FERESU *et al.*, 1998, FERESU *et al.*, 1999).

Já a transmissão pela urina humana ou de humano para humano, é pouco provável dada a acidez da urina ($\text{pH} < 7$) o que inviabiliza a sobrevivência das leptospiras (FAINE *et al.*, 1999, OBAL *et al.*, 2000).

Diferentes estudos demonstram haver associação entre a presença de roedores e infecção por leptospiras na população humana. Os investigadores De Faria e col., (2008) a exemplo de outros autores, identificaram roedores da espécie *Rattus norvegicus*

infetados pelos mesmos serovares daqueles encontrados em pacientes hospitalizados em zona endêmica de leptospirose (DE FARIA *et al.*, 2008). Também os trabalhos de Li e col., (2013) na China demonstraram através de testes serológicos e moleculares, a estreita relação entre leptospiras encontradas tanto em roedores quanto em humanos (LI *et al.*, 2013).

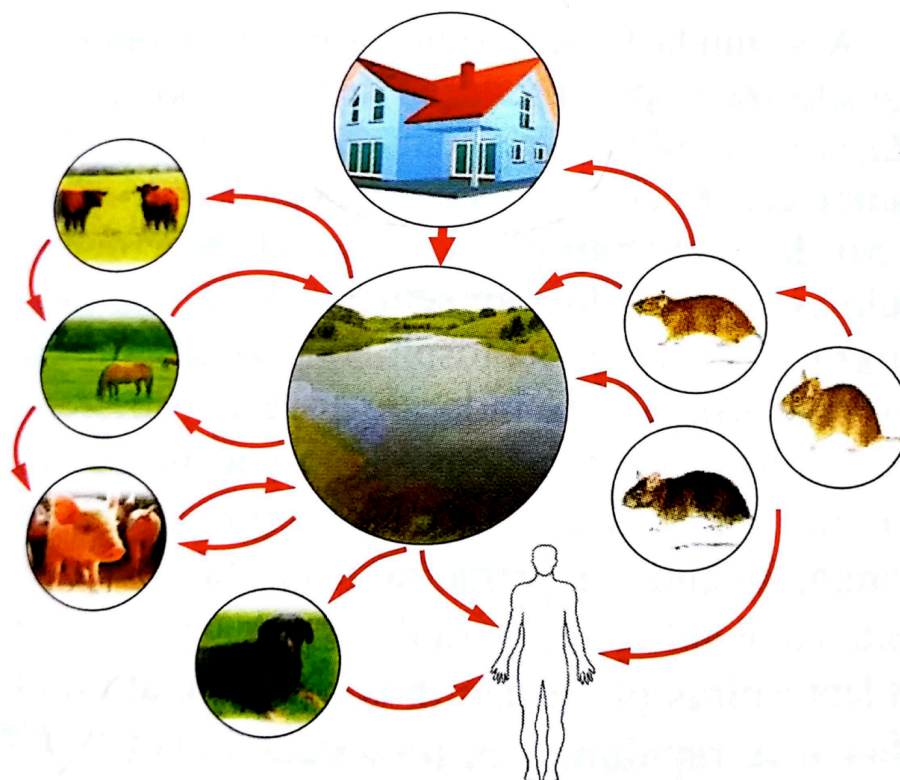


Figura 1.8. Ciclo de transmissão das leptospiras.

(Esquema de Vieira, in: Microbiologia Médica, Vol. 1, 2014)

1.7.2. Reservatórios

O conhecimento relativo a espécies de roedores como reservatórios de leptospiras, remonta aos primeiros estudos realizados com estas espiroquetas por Inada e Ido há um século atrás (NOGUCHI, 1917, FAINE *et al.*, 1999). Hoje sabe-se que uma grande diversidade de espécies silváticas de mamíferos, estão entre as mais estudadas,

podendo ser portadores assintomáticos e portanto “hospedeiros de manutenção” de leptospiros (ELLIS, 2015).

Algumas destas espécies invadem diferentes habitats contaminando o ambiente com leptospiros através da sua urina, o que pode ocorrer em áreas de exploração pecuária ou no ambiente peri-domiciliar (COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2000, LEVETT, 2001, DE FARIA *et al.*, 2008).

Com efeito, os roedores da espécie *Rattus norvegicus* entre outras espécies (Figura 1.9), são largamente descritas como principal disseminadores de leptospiros podendo atingir uma taxa bacteriana elevada comparativamente a outras espécies animais. Já os roedores das espécies *R. rattus* e *Mus musculus* são os mais versáteis em termos de habitat e sinantrópicos ou seja, mais próximos ou mesmo em contacto direto com a população humana (HARTSKEERL AND TERPSTRA, 1996, FAINE *et al.*, 1999, ADLER AND DE LA PENNA MOCTEZUMA, 2010).



Figura 1.9. Três espécies de roedores comensais: A- *Rattus norvegicus*; B - *Mus musculus*; C - *R. rattus*.

(Fontes: (A) www.bio-city.gr; (B) moblog.whmsoft.net; (C) satging.cocmucimm.org)

1.7.3. Hospedeiro

- **Exposição ao agente infeccioso**

As leptospiros patogênicas e intermédias, lembrando que são as únicas espiroquetas responsáveis pela leptospirose, podem ser encontradas no solo e na água, após serem excretadas através da urina de animais colonizados e/ou infetados. No entanto a sua sobrevivência fora de um hospedeiro pode durar meses dependendo de fatores climáticos como a humidade relativa do ar e da temperatura, além da sensibilidade a um meio ácido (pH<7) e à radiação solar (XUE *et al.*, 2009).

Estudos realizados com populações expostas a situações de risco devido a catástrofes naturais (cheias, inundações ou desabamentos), identificaram importantes surtos epidémicos de leptospirose. A proliferação de roedores nas zonas urbanas como fator de exposição para a infeção por leptospiros tem sido reportada por diversos autores em diferentes países e mais recentemente por Romero-Vivas e col., (2013) na Colómbia, Wang e col. (2013) na China, Calderon e col., (2013) na Colómbia e Cosson e col., (2014) na Malásia (ROMERO-VIVAS *et al.*, 2013, WANG AND HE, 2013, CALDERON *et al.*, 2014, COSSON *et al.*, 2014).

Também a atividade ocupacional, como fator de risco à infeção por leptospiros, é conhecida desde os primórdios da descoberta da doença e descrita por diferentes autores entre eles, Alston e col., (1937).

Conhece-se assim uma vasta lista de ocupações/profissões de risco, incluindo trabalhadores de matadouros, veterinários, criadores de animais, camponeses e/ou agricultores, trabalhadores de saneamento, operários de construção civil e até militares entre outras (WHO, 2003).

Além das mencionadas, um número crescente de atividades recreativas e de lazer, constituem igualmente risco de exposição nomeadamente, as atividades aquáticas (natação, canoagem, *rafting*) em coleções de água doce tais como rios, lagoas e barragens assim como as caminhadas ecológicas, visitas a lugares exóticos, caça,

contacto com animais selvagens e a prática de golfe são algumas das mais referidas (HARTSKEERL *et al.*, 2011).

- **Tipo de hospedeiros**

Os hospedeiros de leptospirosas patogénicas, são agrupados em diferentes escalões segundo o estado portador e o desenvolvimento da doença. Assim, são considerados hospedeiros acidentais aqueles suscetíveis a infeção por diferentes serovares, podendo desenvolver formas graves da doença, como é o caso dos humanos. Outros, como por exemplo, os bovinos, são considerados hospedeiros de manutenção, pois adquirem a infeção sem que a mesma lhes cause doença imediata. Entretanto, nestes animais pode ocorrer transmissão para o feto causando aborto e/ou outros distúrbios na lactação sendo que todas estas formas contribuem para disseminar leptospirosas para o ambiente (FAINE *et al.*, 1999, ELLIS, 2015).

É importante referir também, que existem serovares específicos para cada espécie animal. No entanto, a infeção por serovares não específicos pode causar uma doença fatal ao animal susceptível. A importância epidemiológica de se conhecer a prevalência de serovares e os respetivos hospedeiros de manutenção são essenciais para compreender a epidemiologia da leptospirose numa dada região/País (FAINE *et al.*, 1999, LEVETT, 2001).

Autores como De Vries e col., (2014) numa revisão sistemática da leptospirose na África Sub-Sahariana, coligiram uma lista com os principais serovares descritos em diferentes estudos cuja distribuição se mostra muito particular para cada região ou país.

Uma grande variedade de espécies animais, constituem fontes de infeção e hospedeiros de manutenção de serovares circulantes em determinada área geográfica. Entre eles dois grandes grupos de animais se destacam:

i) mamíferos selvagens, bubalinos, cervídeos e camelídeos e,

ii) grupo de mamíferos domésticos tais como: suínos, equinos, caninos além de pequenos e grandes ruminantes, entre eles o gado bovino (ADLER AND DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010, ELLIS, 2015).

Hospedeiros acidentais como os humanos, desenvolvem a doença por vezes fatal, no entanto, e como já foi anteriormente referido, não são descritos como fontes de infecção para outras espécies (FAINE *et al.*, 1999).

1.7.4. Definição de ‘caso’

Dada a diversidade do quadro clínico da leptospirose, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), define “caso” em função de quatro grandes categorias:

- i) quadro de sintomatologia leve semelhante a um síndrome gripal;
- ii) síndrome de Weil caracterizado por icterícia, insuficiência renal, hemorragia e/ou miocardite com arritmia;
- iii) quadro de meningite/meningoencefalite;
- iv) quadro de hemorragia pulmonar com insuficiência respiratória.

Já para efeitos de notificação, o grupo de referência, com a chancela da OMS, denominado *Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)*, adicionou à “definição de caso” os seguintes aspetos:

Sintomatologia consistente com leptospirose e, pelo menos, um achado nos testes laboratoriais nomeadamente: a cultura de amostras biológicas com isolamento de *Leptospira* spp, e a Técnica de Aglutinação Microscópica - TAM que resulte em: i) incremento de quatro (4) títulos de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., em diluições seriadas, desde a fase aguda à fase de convalescença; ii) presença de um título $\geq 1:400$, ou título $\geq 1:100$ em regiões não-endémicas em amostras únicas.

Considera-se ainda “caso presuntivo” quando há sintomatologia sugestiva e a confirmação laboratorial foi feita apenas pelo teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou pelos testes rápidos, ou ainda pela presença de anticorpos IgM ou IgG no teste de imunofluorescência (*Immunofluorescence Assay-IFA*) (WHO, 2010).

Nos animais, as manifestações clínicas são análogas às dos humanos, como as já descritas anteriormente com pequenas particularidades, por exemplo em bovinos, a leptospirose pode causar aborto, “síndrome da gota de leite” de início súbito por envolvimento do trato genital e nos cães pode variar do estado assintomático a nefrite aguda seguido de morte em alguns dos casos (WHO, 2003, ELLIS, 2015).

1.7.5. Leptospirose no Mundo

Estima-se a ocorrência de mais de um milhão de casos de leptospirose em todo mundo (Figura 1.10). Uma maioria, 73% do total de casos e de óbitos ocorrem principalmente nos países tropicais e sub-tropicais. A morbilidade afeta principalmente a faixa etária dos 20-39 anos enquanto a mortalidade se situa geralmente na faixa dos 50-59 anos recaindo ns sexo masculino a maior prevalência (COSTA *et al.*, 2015).

Ainda ao nível global, um estudo recente demonstrou que a leptospirose além de incapacitante reduz a esperança de vida das pessoas afetadas estimando-se em 2,8 milhões de anos perdidos devido à doença, correspondendo a homens em 80% dos casos (TORGERSON *et al.*, 2015).

Entretanto, a doença continua subnotificada em grande parte das regiões o que dificulta a percepção dos dados epidemiológicos reais (WHO, 2011).

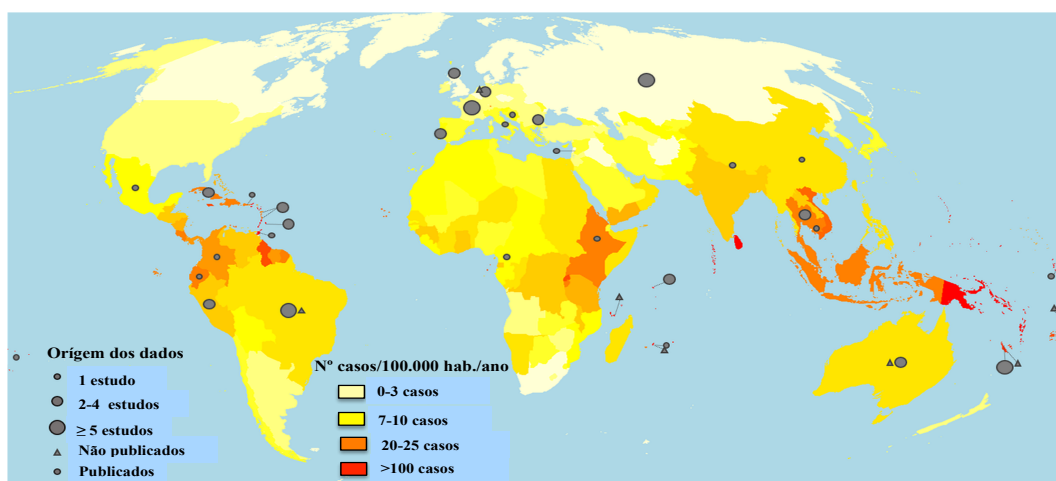


Figura 1.10. Mapa da distribuição mundial dos ‘casos’ de leptospirose no mundo em valores estimados.

(Adaptado de Costa e col., 2015; doi:10.1371/journal.pntd.0003898.g002)

1.7.6. Leptospirose em África

Os dados epidemiológicos da leptospirose humana disponíveis relativos aos países Africanos, são provenientes de estudos pontuais e continuam restritos a alguns

países. Tais estudos indicam taxas de incidência superiores aos encontrados em outras partes do mundo (ALLAN *et al.*, 2015). Já em 2011, a OMS estimava uma incidência média de 95 casos/100.000 habitantes por ano (WHO, 2011).

Os autores De Vries e col., 2014 e mais recentemente Allan e col (2015), realizaram revisões sistemáticas relativas a estudos feitos no referido continente revelando que o sistema de vigilância para a leptospirose mantém-se fragmentado dentro de uma vasta extensão territorial. É importante referir que cada estudo é consistente relativamente à presença de leptospiras circulantes e uma diversidade de serovares com tendência a ser específica para cada zona estudada. O estudo de De Vries e col., 2014, incluiu os dados do presente trabalho apresentados em congresso (FORTES-GABRIEL *et al.*, 2013) os quais estão assinalados no mapa da Figura 1.11, entre outros dados de países da África Sub-Sahariana.

Vale a pena referir que existe um aumento crescente de países no continente Africano a publicar estudos sobre leptospirose, acompanhando técnicas mais recentes apoiadas por laboratórios e centros de referência, a exemplo de Angola de que o presente estudo é um exemplo.

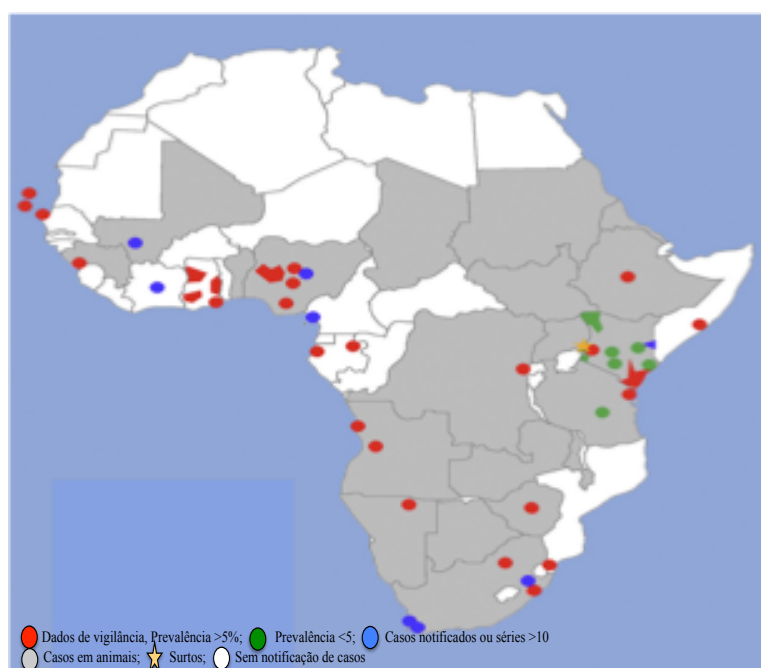


Figura 1.11. Representação do mapa de África, mostrando a distribuição dos estudos realizados na Região Subsaariana, a partir de 1971.

(Fonte: De Vries, 2014)

1.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.8.1. Métodos diretos

- **Observação direta em Microscopia de fundo escuro**

É utilizada em amostras de sangue e de urina com preparação em lâmina e observada em microscópio de fundo escuro. O método é pouco eficaz dada a reduzida chance de encontrar leptospiras nestas amostras, exceto quando o inóculo, isto é, o número de bactérias presentes é grande. Por outro lado, as dimensões (comprimento e diâmetro) das leptospiras que lhe conferem um aspeto fino e translúcido dificulta a visualização, sobretudo com microscopistas pouco treinados (FAINE *et al.*, 1999).

- **Cultura**

A técnica de cultivo de leptospiras como diagnóstico de rotina da leptospirose é feita apenas em laboratórios de referência, dada a exigência em termos de material, equipamento e de controlo de contaminantes. É realizada diretamente a partir de tecido ou fluido frescos (urina, sangue, líquido cefalorraquidiano) com o objetivo de isolar o agente infetante para que possa ser submetido a identificação e a caracterização.

O método é considerado *gold standard*, pois trata-se de uma prova irrefutável da existência de leptospiras num dado organismo (indivíduo ou animal), sendo a confirmação mais substancial do diagnóstico clínico (WHO, 2003). Porém, considerando que o crescimento é fastidioso, difícil e lento, esta metodologia está praticamente excluída da rotina laboratorial, sendo utilizada sobretudo para investigação epidemiológica [estudo em roedores (reservatórios)], ou ainda em estudos *pós - mortem*.

- **PCR**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é uma técnica mais recente, utilizada para o diagnóstico da fase aguda das manifestações clínicas da leptospirose particularmente nos primeiros dias (≤ 6) de sintomas, contribuindo para o apoio do

laboratório ao diagnóstico precoce, podendo ainda ser útil no rastreio de populações suscetíveis.

A técnica é eficiente na detecção de DNA leptospírico por amplificação de fragmentos de genes alvo, constituintes do genoma de *Leptospira* spp. Requer equipamento laboratorial e reagentes específicos e de considerável custo (WHO, 2007).

A PCR é precedida da extração de DNA a partir de fragmentos de tecido, sangue, soro, urina ou líquido cefaloraquidiano do hospedeiro. Atualmente os procedimentos de extração estão muito facilitados, dada a atual disponibilidade de kit's comerciais, sendo recomendável que sejam seguidas as instruções do respetivo fabricante. A extração inicia-se com a lise da membrana das leptospiros usando um tampão de lise (*lysis buffer*), seguida da separação lipídica através da aplicação de álcoois (etanol e propanol). Segue-se um processo de separação dos componentes celulares por centrifugação, para obtenção do DNA genómico, sendo separadas as proteínas através da adição da enzima 'proteínase' e posteriormente eliminadas da suspensão (POSTIC *et al.*, 2000).

A reação de amplificação do DNA microbiano, requer a adição de *primers* (oligonucleótidos iniciadores) assim como de outros reagentes (Mg, H₂O, dNTP, Taq polimerase) que ligarão as bases nucleotídicas correspondentes. O processo requer um termociclador que é programado de acordo com as condições (tempo e temperatura) segundo cada protocolo, permitindo uma série de etapas tais como: desnaturação (*denaturation*), o emparelhamento (*annealing*) e a extensão (*extension*) dos fragmentos da cadeia de nucleotídeos obtidos (WHO, 2007).

Quanto aos *primers*, é comum a utilização de sequências específicas para leptospiros patogénicas tendo como alvo os genes *secY*, *lipL32* e o gene *hapI*, este último desenhado por Branger e col. (2005). No entanto, a PCR com amplificação do gene *rrs* (16S) de cuja amplificação se obtém o fragmento de 331 pares bases (pb) utilizando-se os *primers* denominados A e B, universais para o género *Leptospira*, descrito por Mérien (1992), continua a ser largamente utilizado por vários autores e em diferentes estudos.

Os fragmentos de DNA amplificados são visualizados através do recurso à electroforese em gel de agarose com coloração por "red safe" ou similar, em alternativa

ao brometo de etídio. É ainda utilizado um marcador de peso molecular conhecido que permite identificar, por comparação, a dimensão do(s) fragmento(s) de DNA amplificado. Segue-se a visualização do gel sob luz ultra-violeta que revelam o(s) referido(s) fragmento(s), vulgarmente designados por bandas, ou perfis eletroforéticos condizentes com o DNA alvo a identificar (VIVEIROS *et al.*, 2014).

1.8.2. Métodos indiretos

- **Teste de Aglutinação Microscópica - TAM**

Esta é considerada, ainda hoje, pela OMS a técnica de referência para o diagnóstico laboratorial da leptospirose sendo a única que, por si só, permite determinar o serogrupo ‘presuntivo’ das leptospirosas infetantes.

A técnica consiste na ligação antígeno/anticorpo a qual é visualizada em microscópio de fundo escuro na forma de aglutinação (Figura 1.12), revelando assim a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., em soros de pacientes imunocompetentes, normalmente a partir de aproximadamente duas semanas de infeção podendo no entanto verificar-se a presença dos mesmos a partir do 7º ou 8º dia da mesma (WHO, 2003).

A TAM é realizada utilizando-se uma bateria de serovares de referência na qual constam estirpes oriundas de diferentes partes do mundo assim como estirpes representativas de isolados locais (considerando a localização geográfica onde é realizada). Quando se trata de uma investigação sero-epidemiológica, é possível obter reatividade com anticorpos residuais de infeções anteriores, que tendem a reagir com antígenos (leptospirosas) de serogrupos específicos (WHO, 2007).

A quantificação de anticorpos séricos para um determinado serovar, é feito sob a forma de título, correspondendo este ao inverso da maior diluição para a qual a reação ainda é positiva. O título é assim determinado com base em diluições seriadas do soro (1:100, 1:200...), as quais são testadas face a um ou mais antígenos inicialmente reativos (MARTINS *et al.*, 2014). O valor definido pela OMS como limiar de positividade é de 1:100, podendo corresponder tanto a IgM quanto a IgG. As alterações

deste valor (título) em duas amostras de um mesmo indivíduo, cuja obtenção esteja separada temporalmente de uma semana e meia a duas semanas, permitem observar a cinética dos anticorpos em avaliação, presentes uns na fase inicial e outros na fase de convalescença respectivamente e, na maior parte das vezes, determinar o serogrupo da estirpe infetante envolvida e responsável pelo quadro clínico evidenciado pelo paciente (WHO, 2003).

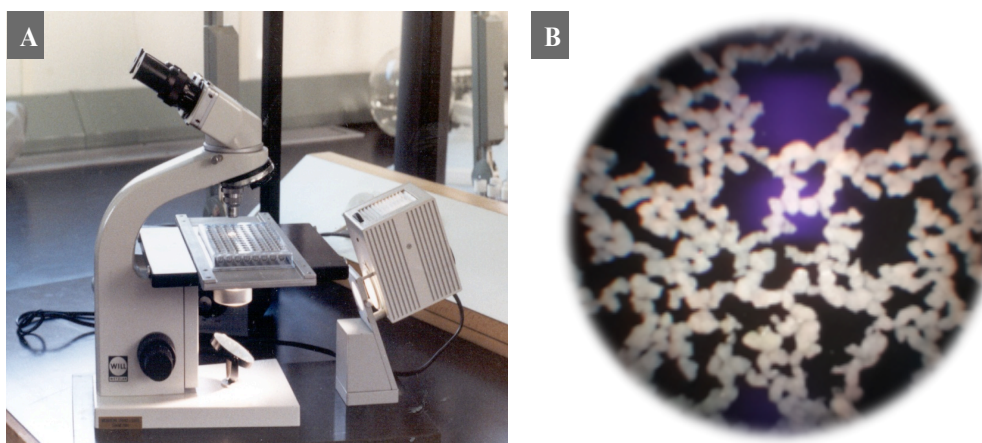


Figura 1.12. Observação microscópica da reação de aglutinação.; A - Microscópio de fundo escuro para visualização do teste (TAM) em placas de microtitulação. B - Imagem da aglutinação

(A – Fonte LLBL/ IHMT-UNL; B – Foto original da autora)

- **Testes Rápidos de Diagnóstico**

Os testes rápidos para a leptospirose foram concebidos para uma detecção fácil e rápida da existência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. São ideais para programas de rastreio, devendo ser sempre que possível, posteriormente confirmados pelo teste de referência (TAM). No entanto, alguns desafios se colocam na especificidade e sensibilidade destes testes, já que o serovar e/ou estirpe usada como antigénio na manufatura do teste, poderá ou não determinar a reação desejada na região do globo onde o mesmo é usado (GOARANT *et al.*, 2013), o que pode produzir resultados falso-negativos.

Entre os testes rápidos, estão os testes de aglutinação macroscópica em lâmina utilizando antigénios preparados com um único serovar ou com um “pool” de serovares.

O resultado é observável após 3 minutos com leve agitação manual da lâmina, que apenas identifica a presença (resultado positivo)/ausência (negativo) de aglutinação (WHO, 2007), tal como ilustra a Figura 1.13.

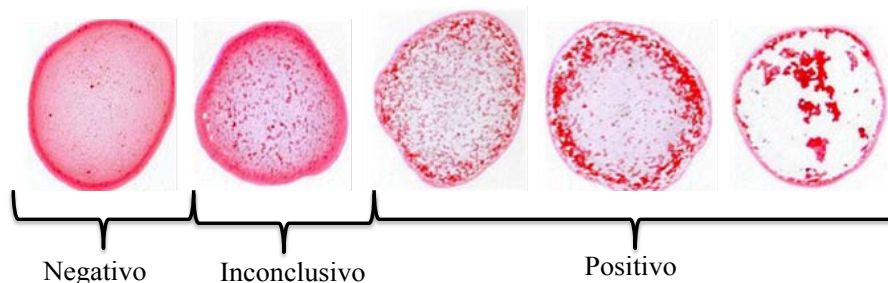


Figura 1.13. Representação esquemática do Teste de Aglutinação Macroscópica em lâmina.

(Adaptado de Savage e col. Eurolepto 2012, comunicação oral)

No que respeita aos testes de diagnóstico rápido comerciais e, geralmente disponibilizados em kit (Figura 1.14), são compostos de pequenas placas retangulares contendo no seu interior uma fita de celulose impregnada com antígeno de *Leptospira* purificado e marcada com anticorpos secundários do tipo M (IgM) e/ou tipo G (IgG). (GOARANT *et al.*, 2013). Ao fazer reagir com o soro ou sangue do paciente com sintomas sugestivos de leptospirose, são evidenciadas duas ou três barras cromatográficas quando a amostra é positiva.



Figura 1.14. Ilustração mostrando, a título de exemplo, os componentes de um kit de Testes de Diagnóstico Rápido (TDR) para diagnóstico de leptospirose.

(Fonte: <http://www.finddiagnostics.org>)

1.9. TRATAMENTO

A perspectiva de tratamento da leptospirose tanto em humanos como em animais, baseia-se na administração de antibióticos de largo espectro tais como a Penicilina e a Doxiciclina, havendo exceção apenas para raros antibióticos como é o caso do Cloranfenicol, pouco eficaz para a leptospirose (WHO, 2003).

Ensaio clínico randomizado, continuam a validar a eficácia dos antibióticos em pacientes com leptospirose a exemplo do estudo realizado por Guidugli e col., (2010) (GUIDUGLI *et al.*, 2010). Também, McClain e col., (1984) já haviam concluído que os pacientes tratados com Doxiciclina reduziram em dois dias o tempo de evolução, sem efeitos colaterais e com redução da leptospirúria comparativamente ao grupo controlo com placebo. Entretanto Costa e col. (2003), observaram a redução da mortalidade depois do tratamento atempado com o uso dos mesmos (MCCLAIN AND L, 1984, COSTA *et al.*, 2003).

1.10. PREVENÇÃO E CONTROLO

O conhecimento das áreas geográficas endémicas de leptospirose, é ainda pouco documentado. Acresce a isto, o facto de haver uma ampla diversidade de serovares que dificulta e por vezes, impossibilita o controlo efetivo da doença (WHO, 2003).

No entanto, a OMS, estabeleceu algumas medidas de prevenção e controlo para a leptospirose nomeadamente:

- i)* o controlo das fontes de infeção como a redução da população de reservatórios e ainda a imunização de cães e animais de produção pecuária;
- ii)* a interrupção da transmissão, com medidas que possam evitar o contacto com a urina dos animais, tais como o uso de calçado apropriado e por vezes até luvas e máscaras;
- iii)* prevenção ao nível de atividades de recreio, como o mergulho e outras atividades em rios ou lagos além de práticas de lazer eco-turísticas;

- iv) adoção de medidas de proteção individual, bem como a educação para a saúde, consciencializando a população sobre os riscos de infeção por leptospiras e,
- v) a desinfeção das superfícies contaminadas pela urina de animais em contexto profissional e/ou residencial (WHO, 2003).

Na perspetiva de avaliação epidemiológica, já os autores Faine e col. (1999), apontavam os principais aspetos na prevenção da leptospirose com base nos quais se destacam:

- i) a vigilância de casos de leptospirose em humanos passando pela identificação e conseqüente notificação de casos;
- ii) vigilância serológica, baseada na técnica de referência (TAM) e,
- iii) identificação da população de risco baseada em dados epizooticos.

Adicionalmente, mencionam ainda o controlo da contaminação, através da desinfeção e outras medidas higiénico-sanitárias tanto no domicílio quando no espaço laboratorial, além das medidas de saneamento do ambiente.

No entanto, constituem desafios para o controlo dos fatores de risco principalmente nos países de baixo rendimento, alguns aspetos tais como a intervenção ambiental no caso de desastres naturais e/ou de inoperância das Instituições vocacionadas para a causa somado ao pouco esclarecimento dos próprios habitantes.

Os Centros Colaboradores e os Centros de Referência da Leptospirose, prestam apoio técnico às ações de diagnóstico, vigilância e controlo da doença levadas a cabo pela OMS, FAO e pela OIE nos diferentes países. Não obstante, a *International Leptospirosis Society* (ILS) fundada em 1994, recorda-se, a maior comunidade científica em leptospirose, procura igualmente fomentar a investigação e a recolha de informação epidemiológica nos países através da divulgação de guiões técnicos e normativos, além do estabelecimento de parcerias e formação de redes e grupos de trabalho (WHO, 2003, 2010, 2011).

No entanto, em Angola não está implementado o diagnóstico laboratorial da doença, nem tão pouco existe prioridade em recursos técnicos e humanos para a sua prevenção e controlo. Não havendo registos sobre leptospirose no País, tanto pelo Ministério da Saúde quanto pela OMS, (WHO, 2013) acredita-se que a doença esteja a

ser tratada como malária, doença bastante notificada e que demanda recursos avultados para o seu controlo. A falta de informação e de evidência científica sobre a possibilidade de ocorrência da leptospirose, pode estar a impedir a atenção necessária em termos de políticas de saúde.

Este trabalho afigura-se pois, como um pequeno mas primeiro contributo para inverter a situação descrita, colocando a leptospirose na agenda dos cuidados de saúde às populações locais. Contribui também, para a implementação no terreno da atual iniciativa “One Health” que une a medicina humana e a medicina veterinária para um fim comum.

**2. ESTUDO SERO-EPIDEMIOLÓGICO DA
LEPTOSPIROSE EM PACIENTES
FEBRIS COM SUSPEITA DE MALÁRIA**

2.1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição mundial e potencialmente fatal em países onde é endémica, geralmente em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2011, COSTA *et al.*, 2015, TORGERSON *et al.*, 2015).

A infeção resulta do contacto direto ou indireto com a urina de animais que transportam leptospiros patogénicas nos seus rins (túbulos renais), sendo o homem um hospedeiro acidental (*cf.* Introdução/Estado da arte) (FAINE *et al.*, 1999). A presença de ratos em áreas carentes de saneamento básico é incriminada como responsável por surtos de leptospirose que somando-se às mudanças climáticas com o aumento de pluviosidade e consequentes inundações, a doença tende a tornar-se emergente ou re-emergente em determinadas áreas (LAU *et al.*, 2010, HARTSKEERL *et al.*, 2011, DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Em Angola, o primeiro e único registo da doença encontrado até ao início da presente investigação, respeita a achados de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., em bovinos, num trabalho realizado por Batista em 1991, como já referido.

Ainda neste país e no que respeita aos humanos, os casos febris e com manifestações clínicas muito semelhantes à leptospirose descritos por Levett (2001), são igualmente tratados como malária em primeira instância, o que é reforçado pelo facto de se tratar de uma zona endémica e hiper-endémica da referida doença (COSEP *et al.*, 2011). Dados atuais mostram que pouco mais da metade dos casos febris são confirmados laboratorialmente (66%) e consequentemente tratados (55%) com combinações terapêuticas tendo como base a artemisinina (ACTs) (MINSa, 2014). Os gastos contabilizados relativos a prevenção e tratamento dos casos diagnosticados como malária são igualmente crescentes, recaindo ao Estado, mais de metade destas despesas (WHO, 2013).

Para o presente trabalho, foi realizado nas Províncias de Luanda e do Huambo, um estudo clínico-epidemiológico utilizando-se uma amostra aleatória de pacientes febris atendidos no Serviço de Urgência de alguns dos Hospitais e Centros de Saúde

com prévia autorização institucional e sob o Parecer do Comité Nacional de Ética em Saúde (*Anexo 6.1.1*), visando os seguintes objetivos:

- i)* aplicar um inquérito clínico-epidemiológico para avaliação da exposição ao risco de leptospirose. detectar anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l.;
- ii)* verificar a distribuição por zonas de residência dos pacientes com soros com evidência de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l.;
- iii)* verificar a relação entre variáveis de exposição e a infeção por leptospirosas;
- iv)* conhecer aspetos clínico-laboratoriais nos pacientes estudados face à referida infeção.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal em que o principal fator de interesse é a presença de infecção por leptospiros em pacientes febris atendidos no Serviço de Urgência de Hospitais e de Centros de Saúde selecionados.

2.2.2. Localização geográfica e caracterização das áreas do estudo

O estudo realizou-se em pacientes Angolanos, atendidos em Unidades Sanitárias situadas nas Províncias de Luanda e do Huambo. A Figura 2.1., mostra o mapa das Províncias e também destaca os municípios de residência da referida população envolvida no estudo.

Angola situa-se a sudoeste do continente Africano, tem aproximadamente 1.246.700 Km² de superfície subdividida em 18 Províncias, 166 municípios e 475 comunas. O clima é variável consoante as duas únicas estações no ano: a do “tempo seco” também chamada “Cacimbo” e a estação chuvosa. A população total estimada aquando do início do estudo foi de 18.576.568 habitantes em 2011 dos quais 29% só na capital (Luanda) e a restante população distribuída predominantemente nas áreas urbanas e peri-urbanas das outras Províncias (INE, 2011).

O grau de literacia foi estimado em 68,6% em maiores de 15 anos, dos quais 81,8% eram homens (INE, 2011). Em termos de Saúde Pública, o perfil epidemiológico das doenças transmissíveis, mostra a malária como primeira causa de morbilidade e de mortalidade, seguindo-se as doenças respiratórias agudas e as doenças diarreicas agudas (MINSa, 2014). A assistência médica à população é um fator que ganhou atenção política graças ao processo de descentralização e revitalização do Serviço Nacional de Saúde em curso no País, recomendado na Cimeira Regional da OMS em 2006, objetivando uma cobertura universal dos Cuidados Primários de Saúde de acordo com a

Declaração de Alma-Ata em 1978 (OLIVEIRA, 2009); Assim, o sistema de prestação de cuidados de saúde subdivide-se em três (3) níveis hierárquicos: *i*) o nível primário, representado pelos Postos e Centros de Saúde ; *ii*) o nível secundário ou intermediário representado pelos Hospitais Provinciais e, *iii*) o nível terciário ou nacional representado pelos Hospitais Diferenciados (WHO, 2013). A atual capacidade de cobertura é de um (1) médico para cada 8000 habitantes, segundo o Bastonário da Ordem dos Médicos de Angola (diariodigital.sapo.pt, acesso em Janeiro de 2014).

Assim, a escolha das Províncias de Luanda e do Huambo (Figura 2.1), deveu-se ao facto de apresentarem uma ascensão importante no desenvolvimento económico e demográfico registado na última década comparativamente à outras regiões do país. Estas Províncias, localizadas em áreas estratégicas do ponto de vista geográfico, apresentam condições climáticas, bio-ecológicas e ambientais, distintas entre si.

A Província de Luanda situa-se na costa Atlântica a $8^{\circ}40'S$ e $13^{\circ}40'E$, com uma superfície de 24.651 Km^2 e apresenta um clima quente e húmido cuja humidade relativa é da ordem de 80% e a pluviosidade inferior a 700 mm. A Província do Huambo por sua vez, situa-se na zona planáltica no centro do território nacional a $12^{\circ}45'S$ e $15^{\circ}45'E$, com uma superfície de 34.274 Km^2 , possui clima frio e seco com humidade relativa de 70% e pluviosidade superior a 700 mm, (MINUA, 2006, MAT, 2013, 2013). Em 2011, as duas Províncias apresentavam uma densidade populacional estimada em 204,7 habitantes/ Km^2 (Luanda) e 42,1 habitantes/ Km^2 (Huambo), respetivamente (INE, 2011).

A maioria da população em Luanda desenvolve atividade do sector terciário e de mercado informal, representando igualmente o maior volume de trocas comerciais e de relações internacionais, comparativamente às restantes Províncias do país. Já no Huambo, a população é maioritariamente camponesa, embora a atividade de comércio informal seja crescente nos últimos anos (INE, 2011).

As Unidades Sanitárias foram selecionadas dentro do Sistema Nacional de Saúde e dos Serviços de Saúde das Forças Armadas Angolanas (subsistema). Todas incluem o atendimento e vigilância epidemiológica das doenças transmissíveis. As mesmas possuíam um laboratório tendo no mínimo, a capacidade de realizar microscopia e mais especificamente a técnica de “Gota Espessa” para pesquisa de

Plasmodium spp, o protozoário agente causal da malária. Também dispunham de profissionais de saúde que auxiliavam na colheita de sangue dos pacientes incluídos no estudo.

Em Luanda, os trabalhos decorreram de Outubro de 2011 a Janeiro de 2012 nas seguintes Unidades Sanitárias: Hospital Pediátrico de Luanda “David Bernardino” e na Clínica do Exército, respetivamente.

No Huambo o trabalho de campo decorreu nos meses de Janeiro a Maio de 2012. Foram abrangidos os Centros de Saúde nos seguintes municípios: Huambo sede, Londuimbale, Bailundo e Caála. Integrou a equipa de investigação, um médico infeciologista, também doutorando do IHMT-UNL (*cf.* Introdução/ Estado da arte pág.4), o qual procedia ao atendimento dos pacientes e preenchimento dos inquéritos.

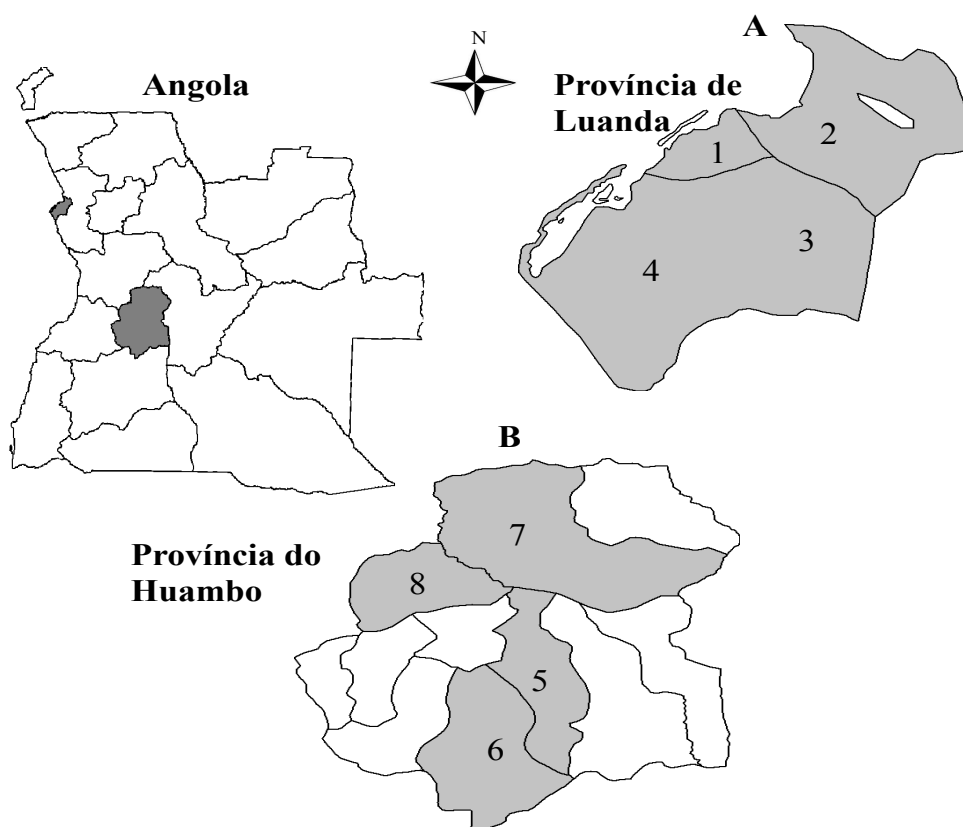


Figura 2.1. Representação esquemática do mapa de Angola assinalando as Províncias (A e B) e Municípios onde se efetuou o estudo: 1 - Luanda; 2 - Cacuaco; 3 - Viana; 4 - Belas; 5 - Huambo sede; 6 - Caála; 7 - Bailundo; 8 - Londuimbale.

(Esquemas originais da autora)

2.2.3. População do estudo

- **Amostragem**

O estudo incluiu uma ‘amostra de conveniência’ do universo de utentes das referidas Unidades Sanitárias. Estabeleceu-se o município como menor unidade de análise para fins de caracterização do local de residência dos pacientes. A amostra incluiu militares atendidos nas respetivas Unidades de Saúde do Exército.

- **Critérios de inclusão e de exclusão**

Para este estudo, foram incluídos pacientes que acorriam aos serviços de urgência dos Hospitais e Centros de Saúde selecionados, como atrás referido, tendo como base a queixa principal “febre” nas últimas 48 horas ou qualquer sinal que indicasse febre no momento do inquérito tal como: “calafrios”, “corpo quente”, medição por termómetro com valores de temperatura acima de 37°C ou ainda pela observação de tremores ou sudação, pelo inquiridor. Pacientes com idade inferior a 15 anos foram igualmente incluídos na amostra de modo a contemplar o maior número de potenciais pacientes na fase aguda e sem interferência medicamentosa.

Foram excluídos do estudo pacientes atendidos no Serviço de Urgência sem queixas relativas a síndrome febril, doentes graves, feridos/traumatizados e/ou queimados.

2.2.4. Aspetos éticos

O estudo implicou a colheita de uma amostra única de sangue (± 2 ml) a cada paciente e a aplicação de um questionário (*Anexo 6.1.3-4*) que incluiu questões clínico-epidemiológicas do Guião de Normas Técnicas da OMS (2003). Toda a informação recolhida foi mantida em sigilo e foi respeitada a privacidade de cada paciente e do pessoal de saúde envolvido no estudo. Não foram abordados os doentes internados e doentes em estado de coma.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Ética em Saúde de Angola (*Anexo 6.1.1*) tendo sido dado conhecimento às autoridades de Saúde de cada Unidade Sanitária envolvida no estudo.

Durante os trabalhos, a equipa de investigação e inquiridores, solicitaram a assinatura do Termo de Consentimento Informado (*Anexo 6.1.2*) a cada paciente incluído no estudo e no caso de crianças, a assinatura do pai ou da mãe ou do adulto responsável pela criança ou na ausência destes, a assinatura do acompanhante. Para pacientes ou acompanhantes iletrados, solicitava-se a impressão digital através da colocação do dedo indicador direito embebido em tinta, na folha de papel preenchida.

A conceção do trabalho e a sua realização não tiveram quaisquer conflitos de interesse ou compensação monetária, apesar do envolvimento das diferentes Instituições e do pessoal técnico.

2.2.5. Inquérito sobre dados clínico-epidemiológicos

O inquérito foi elaborado de acordo com as variáveis de exposição ao risco que se pretendia avaliar, bem como sinais e sintomas conhecidos na literatura relacionados com a leptospirose. Para a aplicação do inquérito utilizou-se suporte em papel com anotação à caneta por um dos membros da equipa de investigadores que dirigia o questionário após a assinatura do Termo de Consentimento Informado.

Numa fase posterior à aplicação do inquérito, os registos foram inseridos no computador em forma de base de dados utilizando-se o programa SPSS[®] *Statistics* (versão 20), para posterior tratamento e análise estatística informatizada.

2.2.6. Obtenção de amostras biológicas e análise laboratorial

Esta componente do trabalho foi realizado nas instalações do laboratório da respetiva Unidade Sanitária e foi integrada na rotina do pessoal técnico na colheita de amostras de sangue destinado a análises clínicas. Para obtenção das amostras séricas, procedeu-se à punção venosa de ± 2 ml de sangue para tubo seco, no membro superior do paciente ou no caso de crianças até aos 5 anos, punccionou-se a veia jugular. A seguir, a

amostra foi centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos para separação do soro e descarte do coágulo do sangue. O soro foi imediatamente acondicionado em tubos *eppendorf*[®] e conservado a temperatura de -20°C para posterior utilização nos testes serológicos e moleculares.

Foram ainda registados os dados dos testes de rotina realizados no laboratório, particularmente os correspondentes à pesquisa de protozoários *Plasmodium* spp (agente causal da malária) efetuada pelo teste de “Gota Espessa” que confirma o respetivo diagnóstico.

Idealmente, no que respeita à leptospirose, teria sido apropriado obter-se uma segunda amostra sérica de cada um destes pacientes após duas semanas correspondendo à fase de convalescença, tal como recomendam as normas do respetivo diagnóstico laboratorial. Porém, dadas as características do Serviço de Urgência no atendimento pontual dos casos mais graves e encaminhamento para outros Serviços, esta ação não se realizou nesta fase do trabalho de campo, pelo que foi assim, obtida apenas uma amostra de sangue por paciente, num total de 650 amostras de igual número de pacientes.

Após o término da fase de colheitas, as amostras (soros) devidamente acondicionadas foram transportadas para Lisboa como bagagem acompanhada e com documentação apropriada para o efeito, tendo à chegada sido depositadas no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (LLBL do IHMT-UNL) para posterior processamento e análise.

- **Análise laboratorial das amostras (soros)**

Com a exceção das técnicas de pesquisa de *Plasmodium* spp e dos testes de diagnóstico rápido de leptospirose efetuados no local, os restantes procedimentos foram realizados no referido laboratório de referência: LLBL, IHMT-UNL.

- **Pesquisa de *Plasmodium* spp**

Tratando-se de pacientes com suspeita de malária, o médico assistente solicitou a confirmação laboratorial do respetivo diagnóstico. A técnica utilizada na rotina dos

laboratórios locais é a “Gota Espessa” e por vezes combinada com a técnica de “Esfregaço Sanguíneo”. Considerou-se confirmação laboratorial para malária, quando utilizando estas técnicas, se constatava a presença de formas parasitárias no sangue compatíveis com protozoários de espécies do género *Plasmodium*. Esta avaliação foi realizada pelos profissionais de saúde pertencentes aos respetivos laboratórios locais, com validação por parte da equipa de investigação.

- **Utilização de Testes Rápidos**

Os Testes de Diagnóstico Rápidos (TDR) ou testes imuno-cromatográficos, foram introduzidos na fase final do trabalho de campo, tendo incluído apenas os pacientes da Província do Huambo. Esta iniciativa deveu-se a integração da equipa de investigação, por razões logísticas, no projeto levado a cabo pelo Ministério da Saúde de Angola (MINSa) o qual objetivava o estudo de arboviroses em síndromes febris durante o período que coincidiu com o presente estudo, na mesma população.

Assim, foram utilizados para rastreio, cerca de 400 kits de testes rápidos para diferentes agentes etiológicos tais como: *Leptospira* spp, arbovírus (agentes causais da chikungunya ou da dengue) e para protozoários do género *Plasmodium*. Estes kits, manufacturados pela BIOLINE, *Standard Diagnosis SD*[®], Coreia do Sul e foram adquiridos pelo MINSa em Fevereiro de 2012.

O teste foi realizado utilizando-se cinco gotas de soro de cada paciente com ajuda de um tubo capilar incluído no kit, conforme as instruções do fabricante, que na prática se resume em colocar o soro cujos anticorpos iriam ligar-se ao antigénio impregnado na película de celulose do kit usando um diluente como veículo fluídico. A leitura dos testes foi feita dentro de 15 a 20 minutos e considerava-se positiva quando surgisse a coloração de mais de uma linha horizontal na placa.

- **Técnica de Aglutinação Macroscópica em lâmina**

Esta é igualmente considerada uma técnica de rastreio e de rápida execução. Para efetuar a mesma, utilizou-se uma solução antigénica previamente preparada pela

equipa do LLBL, HMT-UNL e em uso no mesmo. Tratava-se de uma suspensão de antigénio inativado de serovares do serogrupo Ballum de *L. interrogans* s.l.

Para a realização do teste foi utilizada uma placa de vidro (5x10cm), onde foi colocada uma gota de cerca de 35µl do “soro problema” ao qual se adicionou uma gota de igual volume da suspensão de antigénio (lisado de *L. interrogans* s.l.). Paralelamente, foram efetuados controlos positivo e negativo, usando soros correspondentes existentes na soroteca do laboratório. Após uma agitação manual da placa de vidro durante 3-4 minutos observou-se a presença/ausência de aglutinação, sendo que é a presença desta que traduz o resultado positivo.

- **Deteção de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., pela TAM**

Como já foi referido no início do presente trabalho, esta é uma técnica considerada de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Utilizou-se para este teste uma bateria de 24 serovares universais sendo 23 patogénicos representantes de *L. interrogans* s.l., e um (1) saprófito de *L. biflexa* s.l., (serovar PatocI) representativos de 19 serogrupos (Tabela 2.1).

As culturas desta bateria foram mantidas em meio EMJH líquido (Difco™ Sparks, MD 21152 USA), através de repicagens quinzenais e incubação a 29°C durante 5-6 dias sob agitação permanente em estufa orbital para atingirem a concentração ideal de 2×10^8 células/ml. Após o crescimento, as culturas eram retiradas da incubadora e colocadas ao abrigo da luz em repouso, nunca devendo ocorrer qualquer agitação, pelo menos nas 24 horas antes dos ensaios, conforme protocolo em uso no Laboratório e de acordo com as recomendações da OMS.

Os soros dos pacientes foram diluídos inicialmente a 1:20 em solução de PBS e distribuídos em cada um dos poços da placa de micro-titulação de fundo plano onde foram colocados 35µl em cada um dos respetivos poços. A seguir, foi adicionado, igual volume de cada um dos 24 serovares da bateria em cada poço contendo o soro diluído. As placas foram colocadas em estufa a 37°C para incubação durante duas horas. Após a incubação foi feita a leitura das placas em microscópio de fundo escuro para observar a reatividade de cada um dos soros face a cada serovar. Observaram-se diferentes tipos de aglutinação que em microscópio de fundo escuro permite identificar a proporção de

leptospiras aglutinadas (ligadas aos anticorpos) comparativamente às livres. Para posterior titulação, foram de novo avaliados (no dia seguinte) os soros que no primeiro ensaio reagiram com um ou mais antigénios, apresentando ausência ou até 25% de leptospiras livres. Para esse 2º ensaio, efetuaram-se diluições seriadas crescentes em placa, usando os referidos soros reativos aos quais se adicionaram os antigénios correspondentes aos serovares inicialmente reativos.

Foi considerado como limiar de positividade o título de anticorpos de 1:100, tal como recomendado pela OMS (2003). Os soros positivos foram identificados com o nome do serovar de *L. interrogans* s.l., com o qual se obteve aglutinação com título $\geq 1:100$. Nos casos em que os soros inicialmente reativos não atingiram o referido limiar de título de aglutinação na segunda etapa do teste (diluições seriadas), passou a considerar-se o resultado como *borderline* correspondente a um título de 1:50. Este dado pode significar, de acordo com a OMS (2003), uma situação de endemicidade específica, com presença de anticorpos residuais ou corresponder ao início da produção de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* s.l., traduzindo um quadro de leptospirose em fase inicial.

Tabela 2.1. Constituição da bateria de referência utilizada para este estudo, em uso no LLBL (IHMT).

Serogrupo	Serovar	Estirpe
Australis	Australis	Ballico
Autunalis	Autunalis	Akiamy
Ballum	Ballum	Mus 127
Ballum	Arborea	Arborea
Ballum	Castellonis	Castelloni
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri	3522C
Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
Javanica	Poi	Poi
Louisiana	Louisiana	Salinem
Mini	Mini	Sari
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona
Pomona	Mozdok	5621
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Sejroe	M 84
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
Sejroe	Wolfi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
Semarang*	Patoc	Patoc I

*Serogrupo representante de *L. biflexa* s.l

2.2.7. Detecção de DNA de *Leptospira* spp

- **Extração de DNA**

A extração de DNA dos soros foi realizada utilizando-se um kit comercial Citogene[®] DNA Cell & Tissue Kit da empresa *Citomed* (Lisboa, Portugal) e em uso no LLBL, de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 6.3). O produto da extração foi conservado a -20°C até posterior utilização.

- **Amplificação de DNA leptospírico (PCR)**

Utilização de primers universais (A e B)

Foi feito o ensaio de PCR com o produto de extração de uma parte das amostras (n=200 soros), utilizando-se os *primers* denominados A e B, universais para o género *Leptospira*, previamente descrito desde 1992 (MERIEN *et al.*, 1992), tendo como alvo o gene *rrs* (16S RNA) e que produz um fragmento de 331pb.

Utilização de primers específicos (Hap1)

O DNA extraído das restantes amostras de soro (viáveis para processamento) (n=400), foi submetido a PCR com os *primers* Hap1 (262pb) conforme o protocolo descrito por Branger e col., (2005) tendo como alvo o gene *hap1* (que codifica a proteína associada a hemolisina) específico de leptospiros patogénicas (BRANGER *et al.*, 2005). Após cada ensaio de PCR, os produtos amplificados foram colocados em gel de agarose (2%) com adição de 0,08µl de Red-Safe[®] em substituição da solução de Brometo de Etídio. A eletroforese dos geles decorreu a 130 volts, durante 40 minutos, após o que foi visualizado sob luz UV utilizando-se o equipamento de imagem, Dolphin[®]-1D e software Wealtec[®].

2.2.8. Análise estatística dos dados

Foi construída uma base de dados no Programa SPSS[®], a partir da informação obtida dos inquéritos clínico-epidemiológicos e dos resultados laboratoriais. Os dados foram enquadrados segundo a classificação das variáveis em quantitativas e nominais categorizadas em função das necessidades da análise. A variável ‘idade’ por exemplo, foi agrupada em duas categorias *i*) ‘faixa etária’ segundo a OMS (2011) e, *ii*) ‘<15 anos e ≥15 anos’ destinada a analisar a variável de interesse ‘ocupação/profissão’ e ‘grau de escolaridade’, segundo o indicador usado pelo INE (2011). Os dados ‘missing’ foram designados como: ‘não respondeu’, ‘não aplicável’, ou ‘não fez’ conforme a circunstância.

Foi analisado o pressuposto de ‘Distribuição Normal’ da amostra através do teste de análise de variância para as variáveis contínuas ‘idade’ e ‘tempo de evolução’ da doença. Foram também realizados cálculos de estatística descritiva tais como as

medidas de ‘Tendência Central’ (Média, Mediana, Moda e percentis) além das frequências absolutas e relativas de cada variável do estudo.

Considerando o risco de infecção relacionado com o contacto da pele escoriada ou lacerada, com a urina de roedores quer de forma direta ou indireta no ambiente e, cujos fatores de exposição são já conhecidos, foi analisado o ‘Coeficiente de Correlação de *Pearson* (r)’ para verificar associação estatística. Utilizaram-se para o cálculo as variáveis categóricas (qualitativas) e o resultado obtido pela TAM, através do cálculo do Qui-quadrado com o nível de significância $\alpha=0,05$ (valor de $P<0,05$) e um ‘Intervalo de Confiança (IC)’ de 95%. Este cálculo foi efetuado com as variáveis elegíveis, comparando a relação obtida entre os indivíduos cujos soros foram considerados reativos, com título 1:50 também denominado título *borderline* e os indivíduos de soros com resultado negativo.

A análise estatística foi efetuada com recurso aos manuais de aplicação prática do programa SPSS® (PESTANA AND GAGEIRO, 2008, MARÇO, 2014).

Foi ainda efetuado o cálculo do Título Geométrico Médio (TGM) dos títulos $\geq 1:100$ relativos à aglutinação antigénica e correspondente aos serogrupos identificados, utilizando-se as ferramentas do *Microsoft Office (Windows)* em particular o programa *Excel*. Este cálculo teve por objetivo diminuir a dispersão dos valores dos títulos observados e foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Sokal and Rohlf, 1969 e citada por Vieira (2006):

Título Geométrico Médio (TGM)

$$\text{TGM} = \frac{\text{anti-log } \sum \log x n}{N}$$

Onde: *anti-log* = antilogaritmo; \sum = somatório; $\log x n$ = logaritmo do título multiplicado pelo número de amostras com esse título; N = número total de amostras

Para a construção das tabelas e de gráficos gerados pelo SPSS®, recorreu-se igualmente ao programa *Excel (Microsoft Office/Windows 2010)*.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Características da área do estudo

Foi estudado um total de 650 pacientes com síndrome febril atendidos entre 2011 e 2012 nos serviços de Urgência de 11 Unidades Sanitárias (Tabela 2.2) localizadas em Luanda e no Huambo, durante as duas estações do ano, tempo seco correspondente aos meses de Maio a Junho [n=197 (30,2%)] e no tempo chuvoso, meses de Agosto a Abril [n=453 (69,7%)].

Tabela 2.2. Lista das Unidades Sanitárias selecionadas para o estudo.

Província	Unidade Sanitária	n=	%
Luanda	Hospital Pediátrico de Luanda	109	16,8
	Clínica do Exército	143	22
Huambo	Centro Materno Infantil da Mineira	50	7,7
	Hospital Municipal da Caála	46	7,1
	Centro de Saúde do Casseque	110	16,9
	Centro de Saúde da Calenga	48	7,4
	Hospital Municipal do Londuimbale	35	5,4
	Hospital Municipal do Bailundo	18	2,8
	Hospital do Chilume	21	3,2
	Hospital Militar Regional do Huambo	43	6,6
	Hospital Municipal do Alto-Hama	27	4,2
Total		650	100
(Max.=143; Min.=18; Mediana=46; Desv. Padrão=39,90)			

2.3.2. Características da população do estudo

- **Características demográficas**

A população incluída no estudo era maioritariamente do sexo masculino [n_m =339 (52,2%)]; com idades compreendidas entre os 0 e 70 anos (Figura 2.2 A e B) predominantemente doentes pediátricos (≤ 15 anos) na ordem de 367 crianças (56,5%) tal como mostra a Figura 2.2 A.

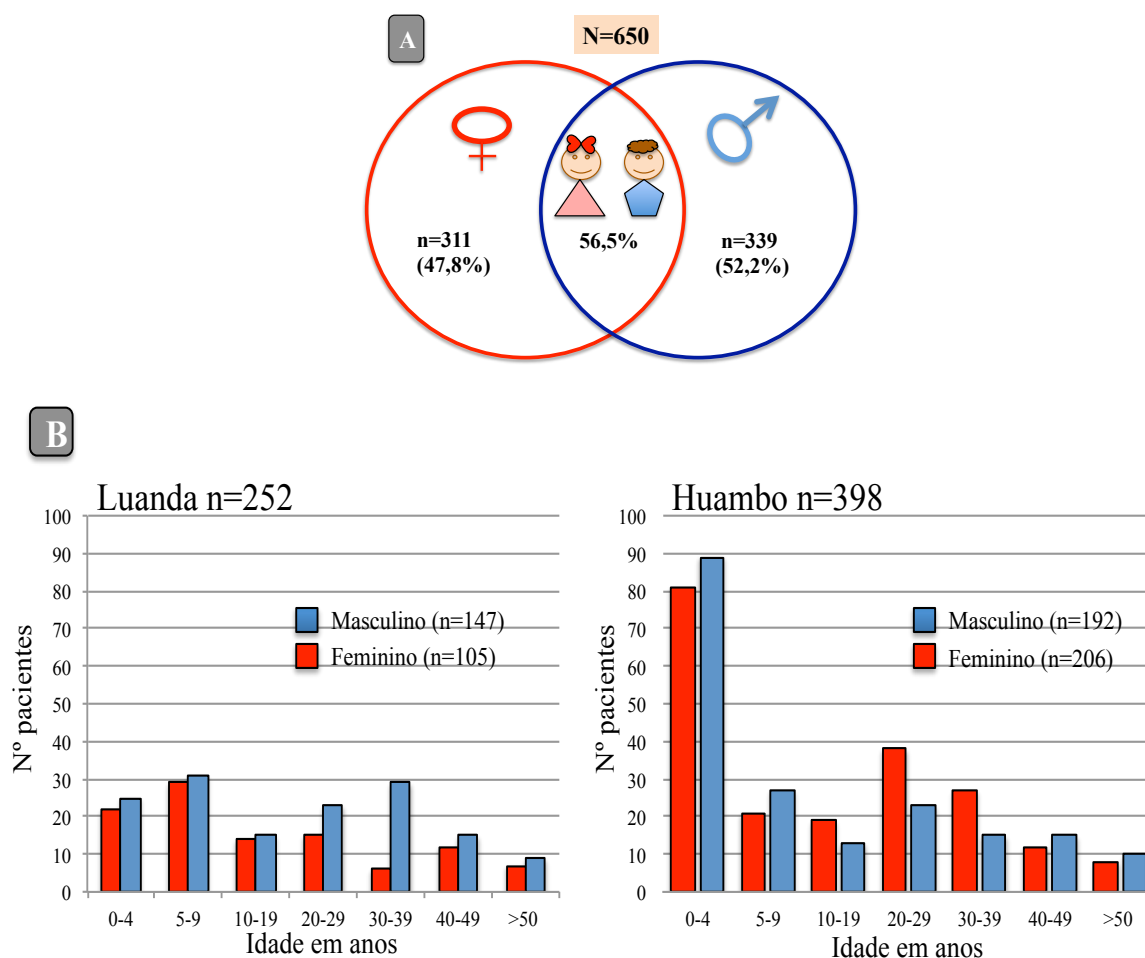


Figura 2.2. Representação gráfica (A e B) da distribuição da população do estudo de acordo com sexo e idade e percentagem de crianças em ambas as províncias.

Residiam nas zonas urbana [$n_u=209$ (32%)]; peri-urbana [$n_{pu}=365$ (56,2%)] e rural [$n_r=76$ (11,7%)], situadas em quatro dos sete municípios de Luanda de acordo com a atual divisão administrativa designadamente: Luanda, Cazenga, Viana, Belas e Cacuaco e em quatro dos onze municípios do Huambo: Huambo, Caála, Londuimbale e Bailundo (Figura 2.1).

O nível de escolaridade a partir dos 15 anos de idade [$n_{\geq 15}=283$] do total da população situou-se entre “nenhum” até “técnico superior”, tendo a maior parte das respostas [$n=88$ (31%)] indicado possuir escolaridade secundária, sendo que Luanda registou o grau de escolaridade mais elevada em relação ao Huambo (Figura 2.3).

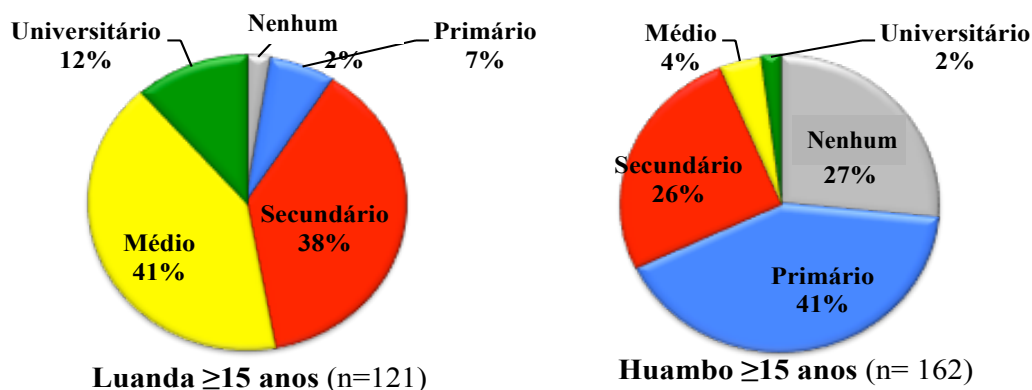


Figura 2.3. Representação gráfica da distribuição dos pacientes por Província, segundo o grau de escolaridade.

A lista de ocupações/profissões referidas por pacientes com idade igual ou superior a 15 anos (n=283), permitiu destacar dois grandes grupos: um grupo que realiza trabalho administrativo (setor terciário) [n_{Adm.}=54 (19,1%)] e outro que se ocupa das atividades do campo (setor primário) [n_{Camp.}=46 (16,3%)]. O conjunto de profissões quando estratificada por Província, revela que o trabalho de campo é realizado maioritariamente pela população de pacientes do Huambo [n_{Hbo}=42 (25,5%)] como mostra a Figura 2.4.

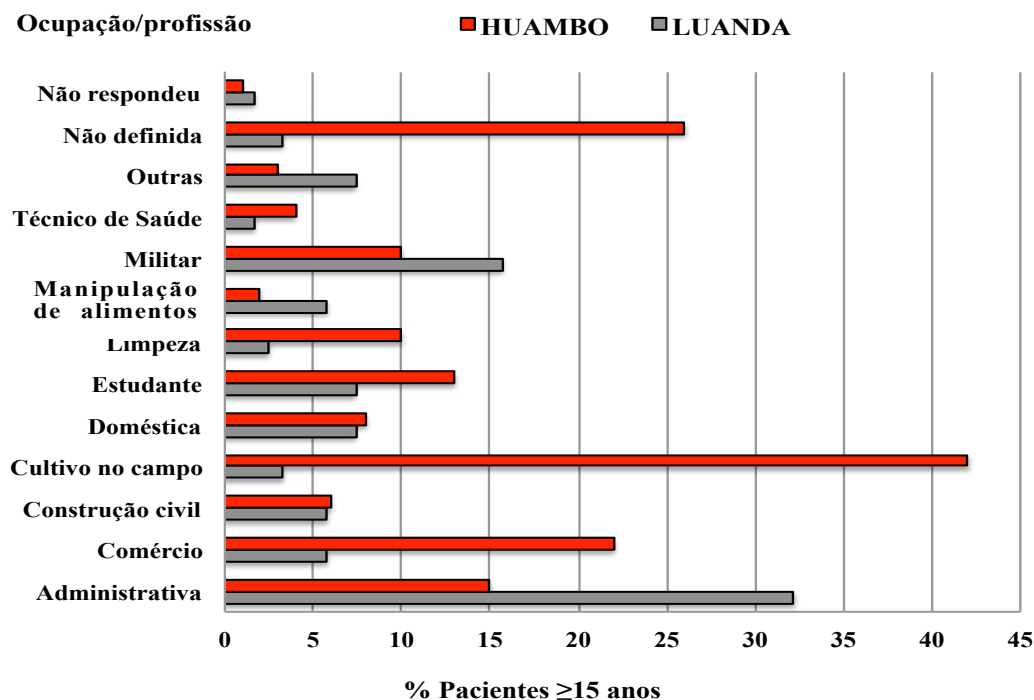


Figura 2.4. Representação gráfica da distribuição dos pacientes de Luanda e do Huambo, com idades acima dos 15 anos de idade (n_{≥15}=283) segundo o tipo de ocupação/profissão.

- **Características ambientais bióticas**

Presença de roedores

Dos pacientes inquiridos (N=650) ou os seus acompanhantes, cerca de 563 (86%) responderam afirmativamente “ter avistado ratos, nas 48 horas antes do inquérito, dentro ou próximo do domicílio”. Quando comparadas as duas Províncias, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$), no entanto, ao nível de município, a Figura 2.5, mostra proporções distintas entre respostas afirmativas e respostas não-afirmativas para a presença de ratos.

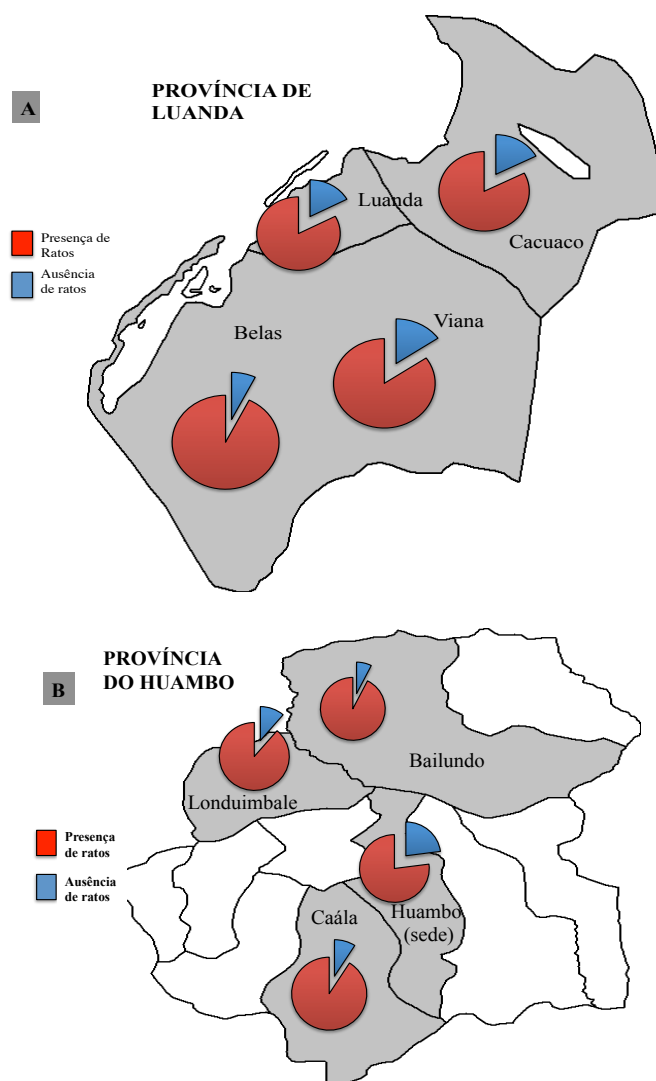


Figura 2.5. Representação gráfica no mapa de Angola da proporção de pacientes de acordo com a indicação da presença de ratos no domicílio ou na proximidade do mesmo em Luanda (A) e no Huambo (B).

Presença de animais domésticos

Dos inquiridos, 60% afirmaram possuir ou lidar com animais domésticos em casa. Os dados obtidos estão representados na Figura 2.6, onde se pode observar a distribuição de cada espécie de animal referida.

Os cães foram os animais mencionados com mais frequência comparativamente a outras espécies, na Província de Luanda. No Huambo, a distribuição foi mais heterogénea, tendo maior expressão a presença de aves (galinhas) em relação aos cães. Também foi evidente a presença de animais de corte tais como bovinos, caprinos e aves principalmente nas zonas peri-urbanas e rurais em ambas as Províncias.

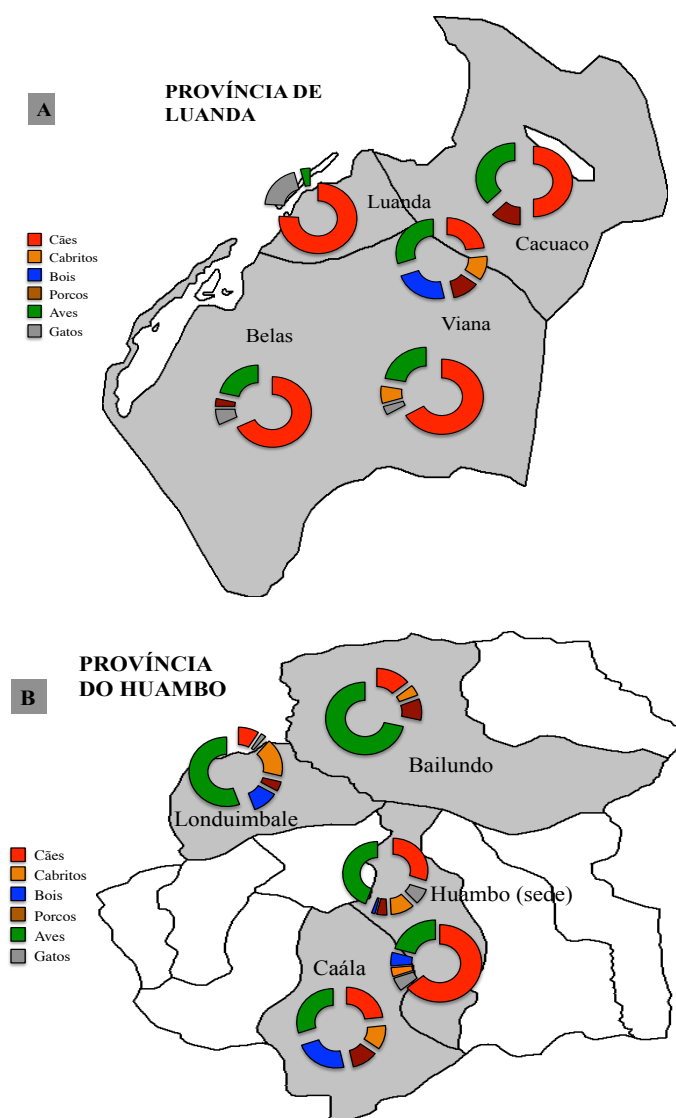


Figura 2.6. Representação gráfica no mapa das duas Províncias (A – Luanda; B – Huambo) da proporção de pacientes segundo a resposta afirmativa em como “lida com animais” e as respetivas espécies.

- **Informação clínica dos pacientes inquiridos**

Tempo de evolução dos sintomas

Dos pacientes inquiridos, 82,5% referiram um tempo de duração da febre inferior a duas semanas. As queixas compatíveis com leptospirose largamente conhecidas, tais como febre, cefaleias, dor muscular (mialgias) e vômitos foram registados em 82,5% (n= 536) das respostas ao questionário (Figura 2.6). Foi igualmente encontrado um pequeno número de pacientes [n=125 (19,2%)] cujos sinais sugeriam distúrbios circulatórios ou hepáticos tais como palidez das mucosas, icterícia e hemorragia.

O total de pacientes inquiridos referiu ter tido febre nas últimas 48 horas. Foi registado pelo menos uma queixa além da febre, destacando-se as queixas relativas ao aparelho gastro-intestinal (27,1%), a tosse (26,9%) e a dor osteo-mioarticular (18%), cuja distribuição é demonstrada na Figura 2.7.

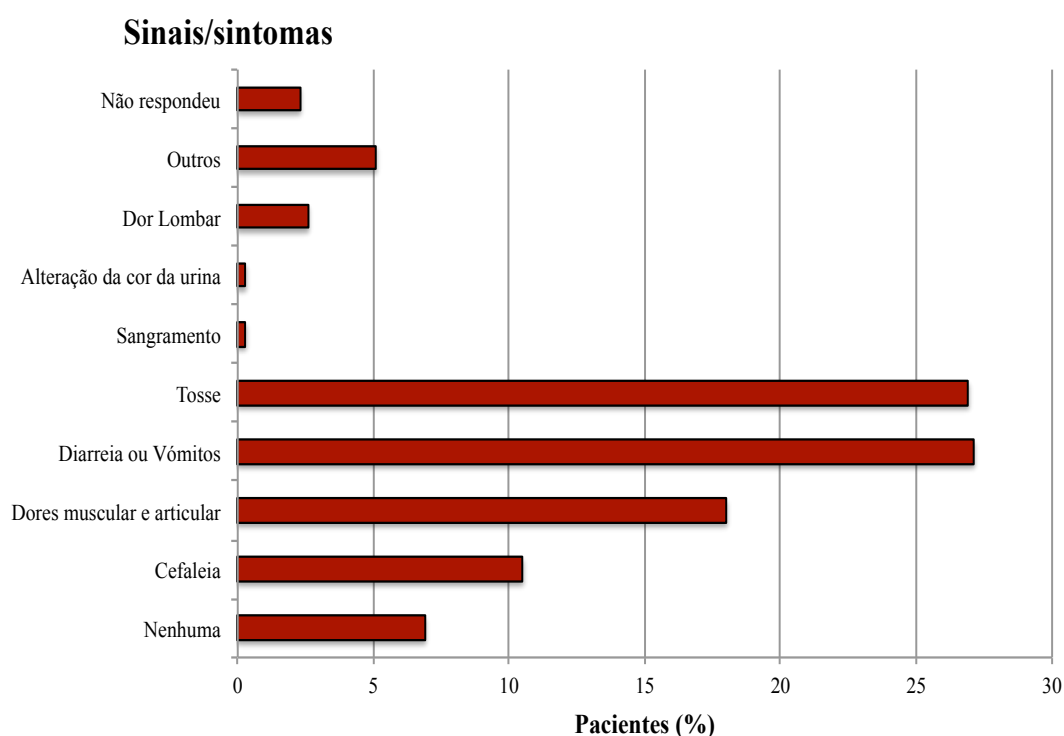


Figura 2.7. Representação gráfica da percentagem dos pacientes febris inquiridos (N=650), segundo os principais sinais/sintomas.

2.3.3. Resultados laboratoriais

- **Confirmação laboratorial dos casos de malária**

A análise laboratorial do sangue pelo teste de Gota Espessa para pesquisa de *Plasmodium* spp, realizada nas Unidades Sanitárias aos pacientes incluídos na população do estudo com suspeita clínica de malária (N=650), resultou em $n_{(+)}=89$ (13,7%) amostras de sangue com resultado positivo, resultado este que pode confirmar a diagnóstico clínico inicial de malária.

Estes pacientes com diagnóstico de malária, residiam predominantemente na zona rural [$n_{(+)}=25$ (26,30%)] comparativamente aos residentes na zona urbana e peri-urbana tendo-se verificado diferença estatisticamente significativa ($P<0,001$) relativo à origem dos pacientes. A comparação entre os pacientes que apresentaram palidez das mucosas vs mucosas coradas, revelou igualmente estar relacionada com a positividade das amostras para *Plasmodium* spp [$n_{(+)}=18$ (18,90%)], obtendo-se diferença estatisticamente significativa ($P=0,03$) para as referidas variáveis.

- **Deteção de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., pelos testes rápidos**

Foi efetuada a Técnica de Aglutinação Macroscópica em lâmina em 252 soros com o referido teste de rastreio, tendo-se obtido resultado positivo em 28 (11,3%) dos 252 pacientes e, em cinco ($n=5$) dos mesmos o resultado foi considerado inconclusivo. A utilização dos testes rápidos (TDR), por sua vez, revelou apenas 2% ($8^+/398$) de soros positivos para IgM/IgG entre os soros testados para a leptospirose.

- **Deteção de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., pela técnica de referência (TAM)**

Foram analisadas 650 amostras de soro correspondentes à totalidade dos pacientes inquiridos no estudo através da técnica de referência para leptospirose (TAM). A Figura 2.8, mostra a distribuição dos resultados obtidos pela referida técnica.

N=650

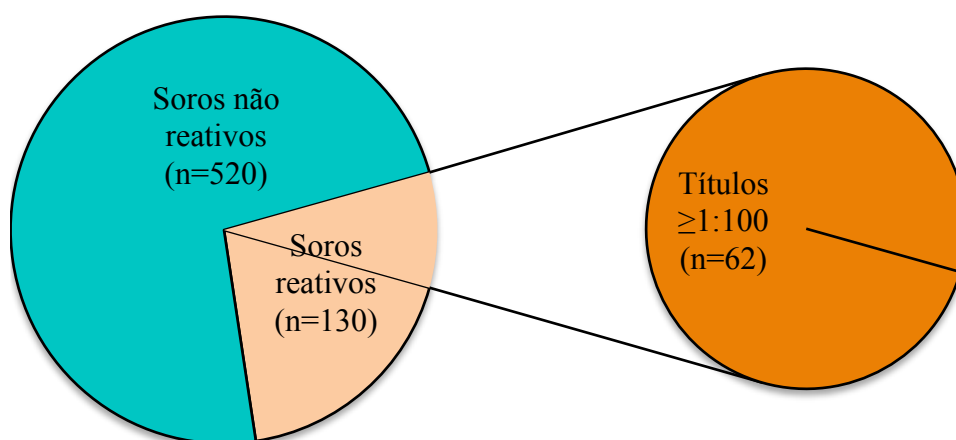


Figura 2.8. Representação gráfica da distribuição dos resultados da TAM, no total de N=650 soros analisados.

Verificou-se que 130 (20%) das amostras revelaram reatividade com pelo menos um serovar de *L. interrogans* s.l., e destas 47,70% (62⁺/130) revelaram títulos $\geq 1:100$, correspondentes à presença de anticorpos específicos o que aponta para uma positividade global de 9,5% (62⁺/650) do total de pacientes, cuja média dos títulos recai nos pacientes com idades iguais ou inferiores a 20 anos, tal como mostra o gráfico da Figura 2.9.

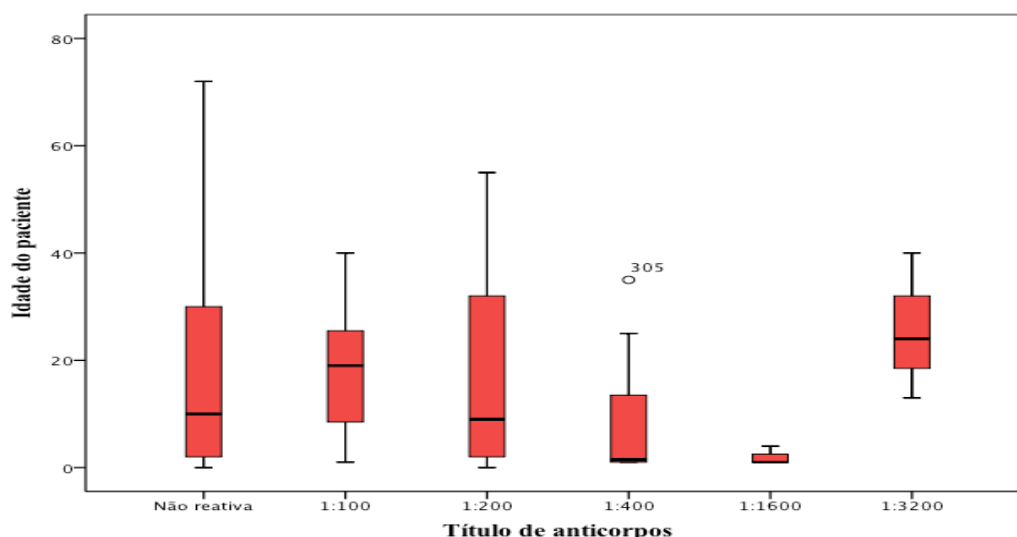


Figura 2.9. Representação gráfica da frequência dos títulos de anticorpos ($\geq 1:100$) obtidos em (62⁺/650) amostras, com a média dos títulos segundo a idade dos pacientes.

Serogrupos predominantes

Para a atribuição de serogrupo(s) predominante(s), foram considerados os resultados de reatividade específica obtidos, incluindo os títulos *borderline* ($\geq 1:50$ e $< 1:100$) por já indicarem uma tendência, conjuntamente com os títulos de aglutinação iguais ou superiores a 1:100, entre os soros analisados neste estudo.

Obteve-se assim um total de sete serogrupos mais predominantes, com base no percentil máximo das frequências relativas. Assim, entre os soros com reatividade mais expressiva na correspondente reação antígeno-anticorpo, constatou-se o predomínio dos serovares pertencentes aos serogrupos: Ballum, Panama, Louisiana, Tarassovi, Australis e Icterohaemorrhagiae, tal como mostra a Figura 2.10.

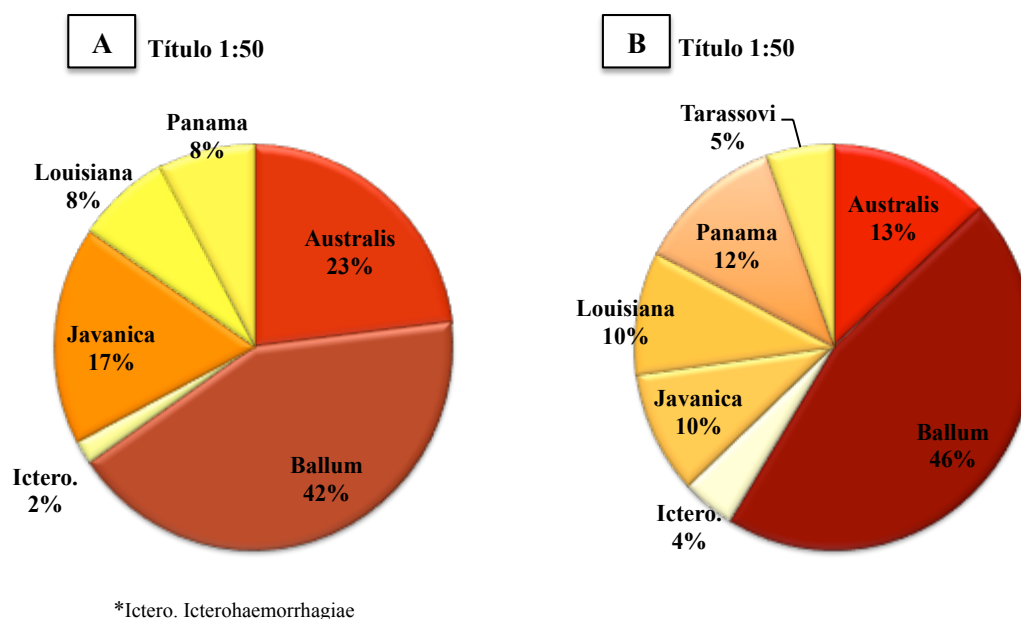


Figura 2.10. Representação gráfica da distribuição dos serogrupos predominantes. A - títulos de aglutinação iguais a 1:50 (*borderline*); B - títulos iguais ou superiores a 1:100.

Foi também calculado o Título Geométrico Médio (TGM) para cada serogrupo identificado com título igual ou superior a 1:100, cujos resultados são referidos na Tabela 2.3, com destaque para os serogrupos Australis, Louisiana Icterohaemorrhagiae e Ballum.

Tabela 2.3. Título Geométrico Médio (TGM) dos serogrupos identificados nos soros dos pacientes.

Soros N=62	Serogrupo presuntivo de <i>L. interrogans</i> (s.l.)	Intervalo do Título de anticorpos	TGM
25	Ballum	[1:100 - 1:3200]	245,5
4	Australis	[1:200 - 1:1600]	671,4
6	Panama	[1:100 - 1:200]	125,8
6	Louisiana	[1:100 - 1:1600]	316,2
2	Javanica	[1:100 - 1:200]	199,5
4	Icterohaemorrhagiae	[1:200 - 1:400]	281,8
5	Tarassovi	[1:100 - 1:400]	199,5
1	Grippotyphosa	[1:100 - 1:200]	N/A
3	Pomona	[1:100 - 1:400]	125,9
2	Canicola	[1:100 - 1:400]	199,5
3	Pyrogenes	[1:100 - 1:400]	158,4
1	Sejroe	[1:100 - 1:400]	N/A

- **Amplificação de DNA leptospírico**

O total de soros (n=513) de acordo com o tempo de evolução dos sintomas (até 6 dias) submetido a ensaios moleculares por PCR em momentos temporais distintos, com recurso numa primeira fase aos *primers* universais A e B e numa segunda fase aos *primers* Hap1, não revelou amplificação de DNA leptospírico.

2.3.4. Características epidemiológicas dos pacientes com infeção/presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l.

- **Local de residência dos pacientes**

Foi feita a distribuição por zona de residência, ao nível de município, dos pacientes cujos soros foram reativos pela TAM. Observa-se na Figura 2.11, uma

distribuição heterogénea dos pacientes de acordo com o serogrupo do serovar/estirpe infetante.

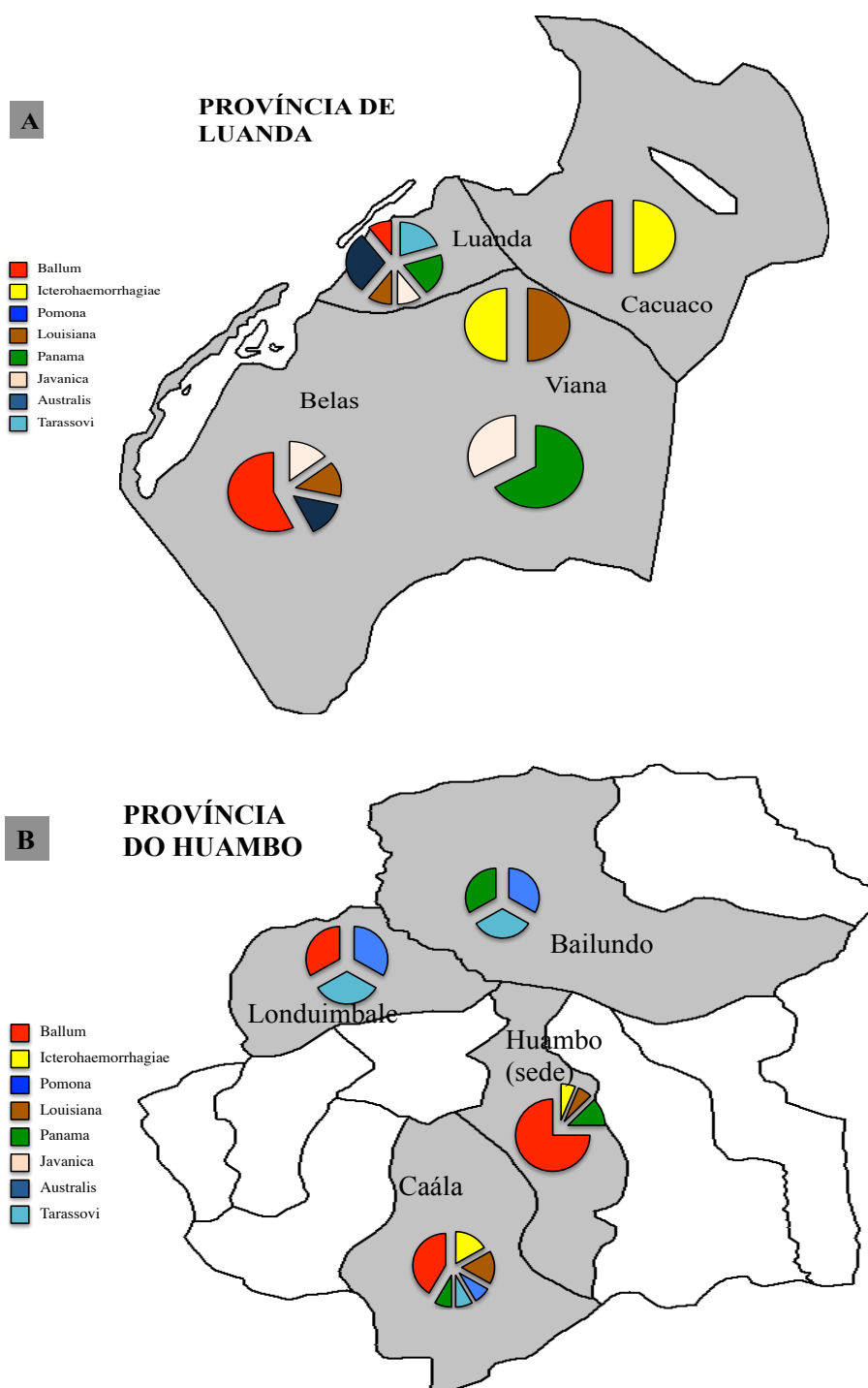


Figura 2.11. Representação gráfica no mapa das Províncias de Luanda e do Huambo, da distribuição percentual dos pacientes cujos soros foram positivos (títulos $\geq 1:100$), segundo os serogrupos identificados pela TAM. A - Luanda ($n=23^+/252$; 9,1%) e B - Huambo ($n=39^+/398$; 10,6%).

Ainda referente à residência dos pacientes, após analisadas as variáveis geográficas e ambientais vs a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas para as seguintes variáveis: residência em Luanda ($P<0,001$), época chuvosa ($P=0,002$), casas com construção em alvernaria ($P<0,001$) e proximidade com lixeiras ($P=0,028$). Os resultados destes cálculos são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Resultados dos testes de associação estatística pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (r) aplicado à diferentes variáveis geográficas e ambientais, face à reatividade pela TAM.

VARIÁVEL	DADOS	REATIVIDADE PELA TAM			QUI-QUADRADO pelo Coef. Correl. Pearson (r)	
		TOTAL	Sim	Não	χ^2	Sign. (valor de P)
Província	Luanda	252 (38,8)	77 (30,6)	175 (69,4)	28.660	<0,001
	Huambo	398 (61,2)	53 (13,3)	345 (86,7)		
Época do ano	Chuvosa	453 (69,7)	76 (16,8)	377 (83,2)	9.704	0,002
	Seca	197 (30,3)	54 (27,4)	143 (72,6)		
Zona de Residência	Urbana	209 (32,2)	49 (23,4)	160 (76,6)	4.729	0,094
	Peri-urbana	365 (56,2)	72 (19,7)	293 (80,3)		
	Rural	76 (11,7)	9 (11,8)	67 (88,2)		
Tipo de Construção	Alvernaria	310 (47,7)	81 (26,1)	229 (73,9)	13.914	<0,001
	Adobe	340 (52,3)	49 (14,4)	291 (85,6)		
Água canalizada	Sim	110 (16,9)	27 (24,5)	83 (75,5)	1.710	0,191
	Não	540 (83,1)	103 (19,1)	437 (80,9)		
Acúmulo de lixo (n=625)	Sim	129 (20,6)	34 (26,4)	95 (73,6)	4.836	0,028
	Não	496 (79,4)	88 (17,7)	408 (82,3)		

- **Sazonalidade da infeção**

De acordo com dados já descritos em Material e Métodos, em Angola existem duas estações do ano, a época chuvosa que vai de Agosto a Maio e a época seca nos meses restantes. Conforme a data do inquérito, foi observada tendência crescente da

percentagem de soros reativos correspondentes à época chuvosa, tal como mostra o gráfico da Figura 2.12.

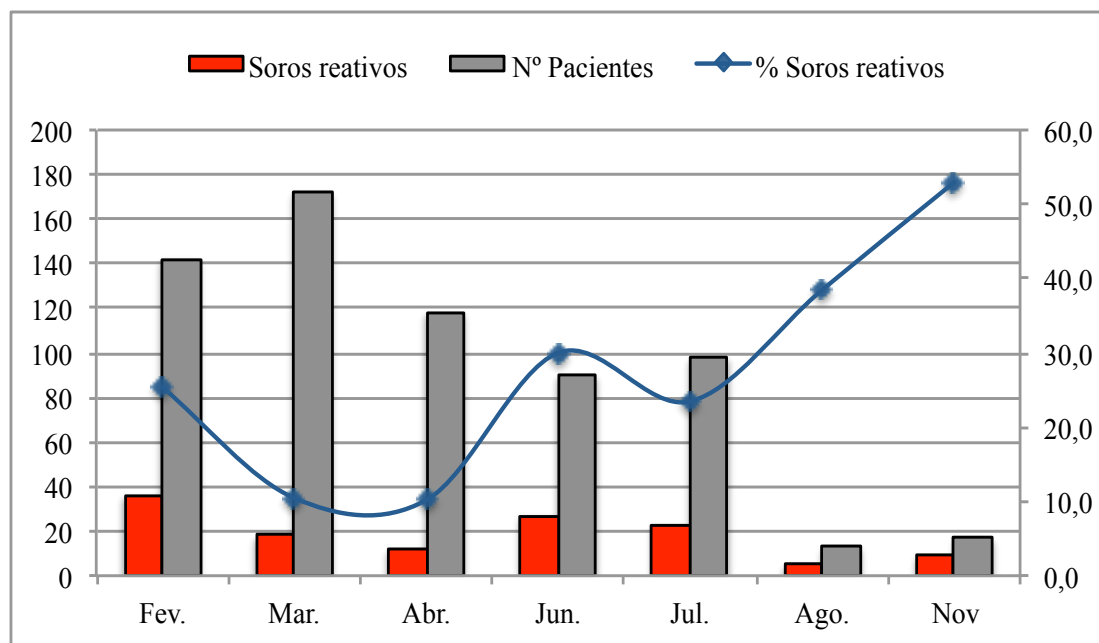


Figura 2.12. Representação gráfica da percentagem de soros reativos (130/650) segundo o mês da aplicação do inquérito e da recolha das amostras em ambas as Províncias (2011-2012).

- **Idade e sexo dos pacientes**

Com a inclusão de pacientes pediátricos, com idades compreendidas entre zero e os 15 anos de idade, estes passaram a constituir a maioria (56,5%, n=367) da população do estudo. Quando comparado esse grupo maioritário de pacientes com os indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos, face à presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os referidos grupos.

No entanto, a faixa etária, de 0 a 9 anos, mostrou a maior proporção de soros reativos comparativamente a outras faixas etárias, tal como mostra a Figura 2.13. Entre indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino, não foi encontrada associação estatisticamente significativa quanto à presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l

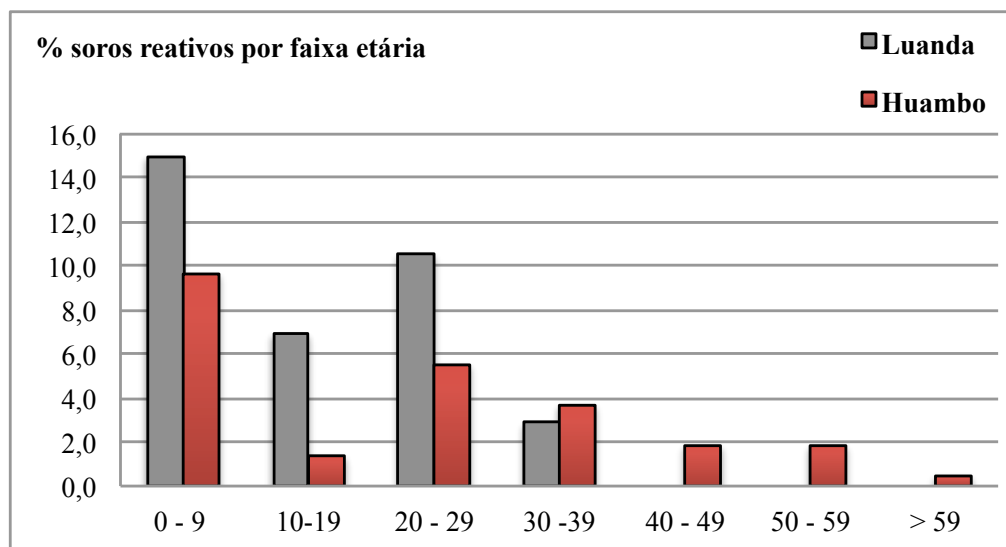


Figura 2.13. Representação gráfica da percentagem de pacientes com soros reativos (130⁺/650; 20%) segundo a faixa etária, em cada uma das Províncias (Luanda e Huambo).

- **Tipo de ocupação/profissão**

No grupo de pacientes com idades ≥ 15 anos (n=220), foi calculada a percentagem de soros reativos segundo a ocupação (Figura 2.14), tendo-se verificado o maior valor em ‘domésticas’ (41,2%), ‘trabalhadores da construção civil’ (38,5%) e ‘técnicos de saúde’ (33,3%). Os pacientes representantes do grupo ‘militares’, obtiveram 13,8% de reatividade quanto à presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., nos respetivos soros.

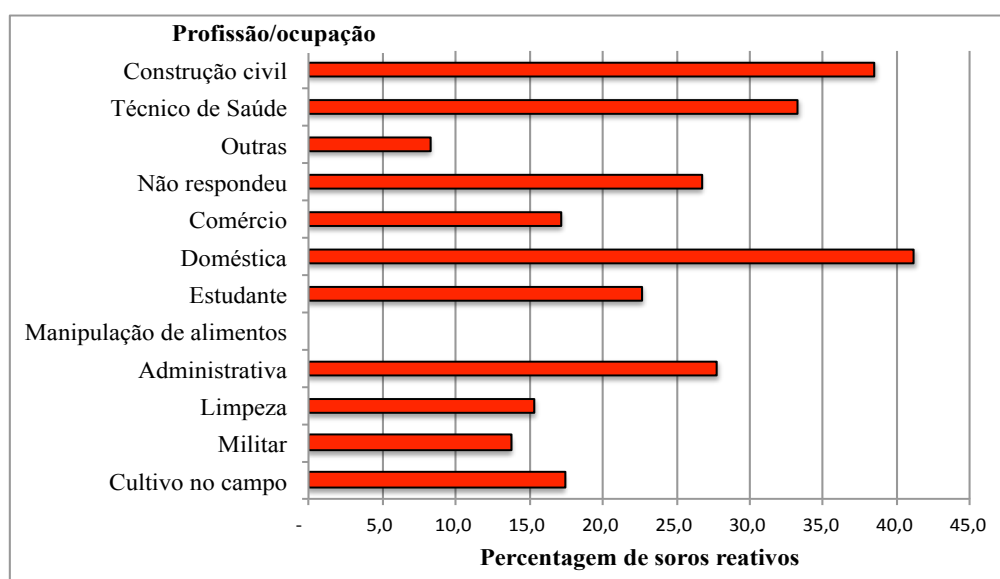


Figura 2.14. Representação gráfica da percentagem de soros reativos de acordo com a ocupação dos pacientes (n=130⁺/650).

2.3.5. Características clínicas da infecção

- **Presença de co-infecção**

Entre os pacientes com soro reativo (n=130), isto é com presença de aglutininas anti-*L. interrogans* s.l., obteve-se evidência laboratorial de co-infecção por mais do que um agente patogénico. Foi assim observada a presença de *Plasmodium* spp, em 20 das referidas amostras reativas, correspondendo a 15% do total de soros reativos, cujo teste de associação entre os dois resultados, para *L. interrogans* s.l., e para *Plasmodium* spp, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre ambos os resultados (Tabela 2.5). No que respeita aos soros com resultado positivo para o arbovírus da Chikungunya [$n_{\text{positivos}}=14$ (3,5%)] nas 389 amostras testadas, observou-se co-infecção em apenas duas destas amostras e portanto não foi testada a relação de associação estatística com os soros reativos para *L. interrogans* s.l.

- **Sinais de distúrbios circulatórios e hepáticos**

Do total de soros com reatividade contra *L. interrogans* s.l., verificou-se que 23 (17,7%) dos pacientes apresentavam sinais de icterícia (Tabela 2.5), cuja diferença foi estatisticamente significativa ($P<0,001$).

Os sinais de hemorragia foram escassos. Todavia em crianças (n=338, 52%), o achado mais comum encontrado nas análises clínicas foram os valores baixos de hemoglobina ≤ 6 , interpretada como anemia grave [(n=167/338, (49,40%)]. Além desta evidência, um total de 80 pacientes apresentava palidez das mucosas e destes, 23 (16%), obtiveram soros reativos na TAM, revelando também uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,037$) no teste de associação.

- **Tratamento corrente com antibióticos**

No decurso do inquérito, foi questionado a cada paciente sobre a toma de medicamentos quer por prescrição médica, quer por auto-medicação. Do total de respostas (n=649), 91 dos pacientes responderam afirmativamente, sendo que 18 destes com resultado positivo pela TAM, referiram ter tomado nas últimas 48 horas, algum tipo de antibiótico. Quando comparada esta evidência com a reatividade no contexto da

leptospirose, obtida pelos referidos pacientes, não se obteve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) para a associação em apreço (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Resultados dos testes de associação estatística pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (r) aplicado às variáveis clínicas face à reatividade pela TAM, no total de inquiridos (N=650).

VARIÁVEL	DADOS	TOTAL	REATIVIDADE PELA TAM		QUI-QUADRADO pelo Coef. Correl. Pearson (r)	
			Sim	Não	χ^2	Sign (valor de P)
Duração do quadro clínico (n=599)	Mais de 15 dias	46 (7,7)	14 (30,4)	32 (69,6)	8.523	0,014
	Menos de 15 dias	553 (92,3)	100 (18,9)	453 (81,9)		
Tomou antibiótico antes da data do inquérito (n=649)	Sim	91 (14,0)	18 (19,8)	73 (80,2)	0.004	0,949
	Não	558 (86,0)	112 (20,1)	446 (79,9)		
Sinais de icterícia (N=650)	Sim	66 (10,2)	23 (34,8)	43 (65,2)	10.123	<0,001
	Não	584 (89,8)	107 (18,3)	477 (81,7)		
Palidez da mucosa conjuntival (N=650)	Sim	80 (12,3)	23 (28,8)	57 (71,3)	4.365	0,037
	Não	578 (87,7)	107 (18,3)	463 (81,2)		
Infecção por <i>Plasmodium</i> spp (n=646)	Sim	89 (13,7)	20 (22,5)	69 (77,5)	1.362	0,506
	Não	557 (85,7)	110 (19,7)	447 (80,3)		

2.3.6. Comparação dos resultados com estudos subsequentes realizados no âmbito das síndromes febris em Angola

No decorrer do presente estudo, tiveram lugar dois outros trabalhos no âmbito académico sobre leptospirose, um na Província de Benguela (GARCIA, 2011) e outro na Província da Huíla (NDEYANELAO, 2014) de estudantes do IHMT, UNL também apoiados pelo LLBL e com a mesma supervisão. Ambos foram realizados em Angola igualmente no âmbito do diagnóstico diferencial das síndromes febris. Os resultados destes trabalhos permitiram comparar os achados relativamente à presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., em pacientes de regiões diferentes do território e de acordo com a respetiva Unidade Sanitária, tal como se observa na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Resultados obtidos pela TAM na população do presente estudo acrescido do número de pacientes estudados em duas outras Unidades Sanitárias nas Províncias de Benguela e da Huíla, em 2011 e 2014, respetivamente.

(Adaptado de Garcia 2011; e Ndayelau 2014)

PROVÍNCIAS	UNIDADES SANITÁRIAS	TÍTULO DE ANTICORPOS ≥1:100			SEROGRUPOS PREDOMINANTES
		TOTAL n	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
LUANDA	Hospital Pediátrico de Luanda	109	16 (14,7)	93 (85,3)	Ballum, Aaustralis, Louisiana, Panama
	Clínica do Exército	143	7 (4,9)	137 (95,1)	Ballum, Australis
	Centro Materno Infantil da Mineira	50	4 (8,0)	46 (92,0)	Ballum, Louisiana, Panama
	Centro de Saúde da Calenga	48	7 (14,6)	41 (85,4)	Ballum, Autralis, Louisiana, Panama
	Centro de Saúde do Casseque	110	8 (7,3)	102 (92,7)	Ballum, Panama
	Hospital do Chilume	21	2 (9,5)	19 (90,5)	Louisiana, Pyrogenes
HUAMBO	Hospital Militar Regional do Huambo	43	4 (9,3)	39 (90,7)	Ballum, Ictero
	Hospital Municipal do Alto-Hama	27	0	27 (100)	N/A
	Hospital Municipal da Caála	46	9 (19,6)	37 (80,4)	Ballum, Ictero, Louisiana, panama, Javanica
	Hospital Municipal do Bailundo	18	2 (11,1)	16 (88,9)	Panama, Tarassovi
	Hospital Municipal do Londuimbale	35	3 (8,6)	32 (91,4)	Ballum, Tarassovi, Pomona
HUÍLA	Hospital Central do Lubango	300	120 (30,3)	89 (29,6)	Ictero., Australis, Ballum, Hebdomadis, Javanica
BENGUELA	Hospital Central do Lobito	141	5 (3,5)	136 (96,4)	Cynoteri, Celledoni
TOTAL		1091	187 (17,1%)	814 (74,6%)	

Por outro lado, a avaliação efetuada com técnicas moleculares visando a amplificação de DNA leptospírico nos pacientes cujo quadro clínico tinha a duração de menos de uma semana, obteve resultados positivos tanto nas amostras de sangue (Huíla) como nas amostras de urina (Benguela) daqueles pacientes (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Resultados do rastreio com testes moleculares nas Províncias da Huíla e de Benguela.
(*Extraído de Garcia, 2011 e Ndeyanelao, 2014*)

PROVÍNCIAS	UNIDADES SANITÁRIAS	TIPO DE AMOSTRA	AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR		GENOSPÉCIES IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAÇÃO
			TOTAL n	Positivo n (%)	
HUÍLA	Hospital Central do Lubango	Sangue	193	30 (15,5)	<i>L. interrogans</i> (s.s.); <i>L. borgpetersenii</i> ; <i>L. kirschneri</i> ;
BENGUELA	Hospital Central do Lobito	Urina	81	13 (16,0)	<i>L. interrogans</i> (s.s.)

2.4. DISCUSSÃO

O estudo agora apresentado explorou pela primeira vez em Angola, a possibilidade de pacientes com quadro febril suspeito de malária terem tido (ou terem) uma infecção causada por bactérias do género *Leptospira* e consequentemente desenvolvido anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. No entanto, os achados revelaram que cerca de 20% do total da população do estudo teve algum contacto com o agente causal da leptospirose.

No entanto, dever-se-à ser cauteloso com a interpretação dos resultados obtidos, apesar da evidência que os mesmos parecem traduzir, no que à leptospirose diz respeito, porque os resultados são apenas de uma amostra única, pelo que não nos habilitam a considerar os pacientes com resultado positivo como ‘casos’ da doença, atendendo ao preconizado pela OMS. Para tal, teria sido necessária uma abordagem clínica mais detalhada e acompanhada de uma segunda amostra que é sempre indispensável para avaliar laboratorialmente a cinética de anticorpos específicos, o que permite demonstrar de modo inequívoco a progressão da resposta humoral por parte de cada paciente e confirmar o diagnóstico.

Por outro lado e, apesar de ter sido uma amostragem de conveniência, segundo critérios estatísticos, os resultados mostraram uma distribuição abrangente tendo em conta a localidade de residência, representando assim os principais municípios de cada Província, o que não invalidou a necessidade de ampliação do tempo e de espaço na recolha das amostras.

Ao mapear os dados obtidos do inquérito aos da população de estudo, encontrou-se uma heterogeneidade na distribuição dos pacientes. Distinguem-se assim as duas Províncias pela proporção das idades, grau de escolaridade, pelo tipo de ocupação dos pacientes, reflexo da maior densidade demográfica e da concentração de recursos na cidade capital, Luanda. que reflete a situação concreta e distinta entre as duas Províncias em termos de desenvolvimento socioeconómico.

A presença de animais de corte (aves, caprinos, bovinos e suínos) junto às habitações, referida pelos pacientes do Huambo diferente do observado em Luanda onde foram mencionados com mais frequência os animais de estimação principalmente caninos, sendo hospedeiros diferentes, podem indicar maior ou menor proximidade com potenciais fontes de transmissão de leptospiras.

Ainda assim, foi marcante o facto de 86% da população do estudo referir a presença de ratos independentemente da área de residência cujo saneamento do ambiente envolvente é ainda um desafio, tendo em conta a falta de acesso à água potável (74,4%) e o acúmulo de lixo próximo das habitações (26,6%).

Em termos clínicos, foram identificados sinais e sintomas comuns a diferentes doenças que cursam com febre, no entanto as queixas principais nomeadamente a diarreia, vômitos, tosse, dores no corpo e icterícia além de estarem associadas à reatividade dos soros enquadram-se na sintomatologia da leptospirose e são comparadas aos achados dos estudos realizados por outros autores (ABGUEGUEN *et al.*, 2008, VANASCO *et al.*, 2008).

Curiosamente, nestes pacientes febris, a confirmação laboratorial do diagnóstico de malária mostrou a presença de *Plasmodium* spp, apenas em 89 (13,7%) do total de pacientes com suspeita clínica, dos quais 15,4% também obtiveram amostras reativas anti leptospiras, porém não foi encontrada associação estatística favorável à co-infecção. Este resultado pode ser confrontado com os dados publicados através do relatório do Ministério da Saúde Angolano, que identifica pouco mais de metade de casos de malária confirmados laboratorialmente entre os casos registados da referida doença (MINSa, 2014). A mesma informação reforça o pressuposto de que a malária está sobrestimada entre as síndromes febris, comuns a distintas doenças entre elas importantes zoonoses tal como descreve Biggs e col. (2011) quando analisou os resultados de pacientes febris no norte da Tanzânia (BIGGS *et al.*, 2011). Admite-se assim, que os pacientes com síndrome febril nas áreas do presente estudo, estejam a ser incorretamente tratadas com anti-maláricos.

Os resultados do teste de referência para a leptospirose (TAM), embora com as limitações já referidas, mostraram uma percentagem relevante (20%) de soros reativos (*borderline* e positivos) contra os diversos serovares de *L. interrogans* s.l., sugerindo

que estes pacientes haviam tido algum contacto com aquele agente infeccioso. O limiar de positividade (*borderline*) considerado por Vijayachari e col. (2001) na Índia, como o título mais esperado em zonas de baixa endemicidade, pode estar a indicar uma resposta humoral específica do hospedeiro nas áreas estudadas, situação que se admite acontecer no presente estudo.

A diversidade dos serogrupos encontrados, apresenta-se mais marcada nas zonas de maior acesso em termos de redes rodoviárias e trocas comerciais e de grandes aglomerados populacionais como é o caso de Luanda, Belas, Huambo e Caála comparativamente aos municípios mais isolados como Cacuaco, Lenduimbale e Bailundo. Outras características refletem a dinâmica geográfica recente tais como: movimento portuário intenso, prática do comércio ambulante e recente ocupação do espaço com tendência à expansão urbana com novos reassentamentos da população.

Os serogrupos predominantes sobrepõem-se ao conjunto encontrado em pacientes febris estudados nos diferentes países da África Sub-Sahariana (DE VRIES *et al.*, 2014), mas, particularmente no que se refere ao serogrupo Ballum, obteve-se um número elevado nas nossas amostras ao contrário do estudo de Biggs e col., (2011) na Tanzânia, em que este serogrupo não faz parte dos mais predominantes. Em termos de títulos de aglutinação, um dos três valores mais expressivos foi o do serogrupo Icterohaemorrhagiae (TGM=281,8), o qual a literatura aponta como responsável pelas formas de leptospirose grave, ou mesmo muito severa.

No entanto, a maior percentagem de pacientes com soros com resultado positivo foi encontrada em pacientes cujas habitações têm construção característica de zonas peri-urbanas (alvernaria) ao contrário das rurais (casas de adobe) comumente referidas por diversos autores como zonas com maior número de determinantes da doença. A mesma tendência foi encontrado por Bello e col., (2012) quando analisava uma série histórica de casos de leptospirose na Colômbia e comparou os resultados por local de residência (BELLO *et al.*, 2012).

Não deixa também de chamar a atenção o número elevado de soros reativos de pacientes em idade pediátrica, principalmente dos 0 aos 9 anos, que consideramos como grupo protegido das ocupações/profissões de risco que geralmente são praticadas pelos adultos ou por indivíduos com idade superior a 15 anos. Este perfil mostra uma

tendência contrária aos dados de registos recentes feitos ao nível global por outros autores, que apontam a maior percentagem de positividade em adultos em idade produtiva (Costa e col. (2015), Allan e col. (2015) e Torgerson e col. (2015). A tendência também se reverte quando comparamos a presença de infeção quanto ao género, onde constatamos maior percentual no sexo feminino, resultado também encontrado no Hospital do Lubango por Ndeyaneylau (2014). Acreditamos que fatores culturais de Angola além da conhecida exposição ao ambiente envolvente contaminado, possam estar na base destes resultados.

A sazonalidade da infeção encontrada neste estudo relativa à pluviosidade, fator intrinsecamente ligado ao risco de transmissão das leptospiras, mostra que na época das chuvas aumenta o valor percentual de reatividade. Estes dados são comparáveis a registos publicados por outros autores (BOQVIST *et al.*, 2012, DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Relativamente aos sinais e sintomas dos pacientes, foi evidente a semelhança das manifestações clínicas com um quadro típico de leptospirose, tal como é descrito por Levett (2001) ou por Faine e col., (1999). Esta observação é reforçada pelo facto de que a presença de icterícia e de mucosas pálidas ou sinais de anemia mostraram associação estatística com a reatividade dos soros, em que estes sinais aparecem associados a formas de leptospirose grave também denominada “doença de Weil” amplamente descrita na literatura.

No que respeita aos resultados dos ensaios moleculares, ao contrário dos trabalhos de Ndeynelao (2014) e Garcia (2012), no presente estudo os resultados foram negativos quanto à presença de DNA leptospírico nos soros avaliados, o que pode refletir uma fase tardia da infeção embora a maioria dos pacientes (85,1%) tenham referido início da febre com menos de duas semanas. No entanto, nos testes serológicos, encontramos associação estatística com reatividade contra antigénios de *L. interrogans* s.l., em pacientes que referiram ter febre há menos de 15 dias. Por outro lado, constatamos que 14% dos pacientes haviam tomado algum tipo de antibiótico nas últimas 48 horas e que eram maioritariamente pacientes cujos soros tiveram resultado negativo pela TAM. Tratando-se de bactérias muito sensíveis aos antibióticos comuns, tal como descrevem vários autores (GUIDUGLI *et al.*, 2010), acreditamos que o referido fator tenha influenciado os resultados da PCR realizada com os soros destes pacientes.

Em suma, a TAM, teste de referência da OMS para a leptospirose, mostrou evidência laboratorial da infecção por leptospiras na população estudada das duas Províncias numa determinada janela temporal. Revelou-se também um padrão relativo à distribuição de serogrupos, compatível com as características sócio-demográficas e ambientais da população estudada.

Apesar da ausência de uma segunda amostra de soro na fase de convalescença, bem como o seguimento clínico devido, os resultados do estudo apontam claramente para a necessidade de se incluir a leptospirose no diagnóstico diferencial face a síndromes febris suspeitas de malária.

3. IDENTIFICAÇÃO DE *LEPTOSPIRA* SPP EM RESERVATÓRIOS SILVÁTICOS

3.1. INTRODUÇÃO

Na sequência do estudo anterior realizado numa população de pacientes febris com suspeita de malária, esta parte da tese vem complementar o conhecimento sobre leptospirosas circulantes nas mesmas Províncias através da verificação do estado portador dos roedores, os seus principais reservatórios.

O papel dos roedores na transmissão de leptospirosas através da urina, tal como já referido, é largamente conhecido desde há um século atrás por Ido e col. (NOGUCHI, 1917, FAINE *et al.*, 1999, LEVETT, 2001, ADLER, 2015) . São assim considerados reservatórios e focos naturais destes patógenos que constituem uma ameaça para a Saúde Pública, considerando o risco de leptospirose quer em humanos quer em animais (BROWN AND GORMAN, 1960, COLLARES-PEREIRA *et al.*, 1997, DE FARIA *et al.*, 2008, SCIALFA *et al.*, 2010).

O tema é largamente estudado em diferentes países. Em Portugal por exemplo, Collares-Pereira e col., (2000) encontraram uma taxa bacteriológica de 82,9% por leptospirosas em roedores na ilha Terceira /Açores, revelando ser aquele Arquipélago uma área endémica e de alto risco de transmissão de leptospirosas (COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2000). O referido estudo contribuiu para o desenho de projetos de intervenção no terreno, no âmbito da epidemiologia e controlo da doença em humanos na mesma área (WITMER *et al.*, 2004).

A transmissão e o risco de infeção tendem a aumentar originando a emergência e a re-emergência de casos de leptospirose em áreas onde a doença era desconhecida. Este facto deve-se às mudanças climáticas traduzidas no aumento das chuvas e consequentes inundações, assim como à prática de diferentes tipos de atividades ocupacionais e de lazer do mundo moderno tais como o ecoturismo exótico, a canoagem e outras (HARTSKEERL *et al.*, 2011, DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Por outro lado, a identificação de novos serovares circulantes numa determinada área, é igualmente objeto de estudo de vários autores. Por exemplo, Bourhy e col., isolaram estirpes de leptospirosas em pacientes humanos nas ilhas francesas do Este do Índico, tendo estas revelado características diferentes comparativamente as já conhecidas, tendo mais tarde caracterizado um novo serovar a partir daqueles achados

(BOURHY *et al.*, 2013, BOURHY *et al.*, 2014). Em África, novos serovares circulantes haviam sido igualmente identificados no Zimbabue e na Tanzânia a partir de roedores (FERESU *et al.*, 1998, MGOODE *et al.*, 2006).

As espiroquetas do género *Leptospira* colonizam os roedores com elevado tropismo pelos rins, mais propriamente para os túbulos renais, o que leva à contaminação do ambiente através da urina (LEVETT, 2001, ADLER AND DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010); estas bactérias sobrevivem na água e no solo durante meses dependendo das flutuações sazonais (HOLT *et al.*, 2006).

Os ratos são animais sinantrópicos dada a necessidade de meios essenciais à sua sobrevivência: água, alimento e abrigo. Fatores estes que concorrem para que as espécies *Rattus rattus*, *R. norvegicus* e *Mus musculus*, entre outras, escolham geralmente as habitações humanas e áreas de confinamento de animais de produção pecuária (BROWN AND GORMAN, 1960). Outros fatores ecológicos como a ausência de predadores naturais (felinos, canídeos, aves de rapina, répteis e outros) são importantes no aumento da densidade populacional de roedores e consequente aumento da dispersão de urina contaminada destes pequenos mamíferos (FAINE *et al.*, 1999).

Angola, país situado na zona tropical, reúne condições de vulnerabilidade à presença de roedores pelo deficiente saneamento básico, tal como demonstrado através do inquérito a pacientes febris (*cf.* Estudo 1). Porém, até ao momento, no país não se tem em consideração o estado portador de leptospiros nestes pequenos mamíferos que vivem ao redor das habitações e tão pouco se fizeram estudos sobre fontes de infeção por leptospiros.

Para iniciar o conhecimento neste contexto o presente estudo definiu os seguintes objetivos: *i*) identificar as espécies de roedores capturados junto dos aglomerados populacionais urbanos e peri-urbanos; *ii*) conhecer o estado portador (taxa bacteriológica) de leptospiros nos roedores; *iii*) obter isolados de *Leptospira* spp a partir da técnica de cultura em meio seletivo; *iv*) verificar o estatuto patogénico dos isolados; *v*) caracterizar os isolados através de técnicas fenotípicas; *vi*) caracterizar os isolados por técnicas serológicas e, *vii*) caracterizar os isolados por técnicas genotípicas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Área do estudo

A área escolhida para o presente estudo foi baseada nos dados de proveniência dos pacientes febris, com alguma suspeita de infecção por leptospiros, e que foi objeto do estudo anterior (*cf.* Estudo 1). Assim, as armadilhas para a captura dos roedores foram colocadas em localidades específicas nas Províncias de Luanda e do Huambo tendo em conta a maior concentração populacional dentro das zonas urbana, peri-urbana e rural. Entretanto no Huambo as capturas foram realizadas apenas no município sede no qual se designaram três zonas diferentes: norte, centro e sul.

Distribuíram-se as armadilhas ao acaso pelos moradores e voluntários que as colocavam aleatoriamente em três biótopos diferentes: campo aberto, domicílio e lixeiras. O local de captura de cada animal era assinalado por coordenadas geográficas pelo ‘Google Earth’ disponível em <https://www.google.com/earth/explore/products>.

3.2.2. População de roedores

- **Amostragem**

Foi realizada uma amostragem heterogénea ou de diversidade. Considerou-se amostra, o total de capturas efetuado. O êxito da captura dependeu da colaboração dos membros de cada comunidade na colocação e retirada das armadilhas. De referir que nas mesmas localidades se dispunha já de uma importante informação, 86% dos indivíduos residentes haviam afirmado ‘ter avistado ratos’ no interior ou ao redor da casa (*cf.* Estudo 1).

Captura dos roedores

Ao se iniciarem as capturas, foi solicitada colaboração dos membros da comunidade e simultaneamente foram adquiridas as armadilhas disponíveis no mercado local. Foram encontradas apenas as do tipo “gancho”, letais no ato de captura (Figura 3.1A). Assim, contactou-se artesãos locais para manufatura de armadilhas do tipo

Tamahawk[®], tendo as mesmas sido compradas pela equipa. Devido a estas limitações logísticas, as referidas armadilhas apenas puderam ser utilizadas numa segunda fase dos trabalhos. Por este motivo, distinguiram-se duas fases de captura em períodos distintos:

a) A primeira fase decorreu em Luanda de Maio a Junho de 2012 na estação seca e foram usadas armadilhas do tipo “gancho”, no processo de captura, ficando designada “fase piloto”. Nesta metodologia a armadilha sacrificava o animal no ato da captura.

b) A segunda fase decorreu em Luanda e também no Huambo, entre os meses de Fevereiro a Abril de 2013, durante a estação das chuvas, tendo sido utilizadas armadilhas do tipo *Tamahawk*[®] de tamanho médio (40cm x 20cm) construídas artesanalmente (Figura 3.1B) a pedido da equipa, com já referido. Estas armadilhas, após a captura do animal, mantinham-no vivo até à realização dos procedimentos laboratoriais de obtenção das amostras biológicas alvo (órgãos e tecidos).

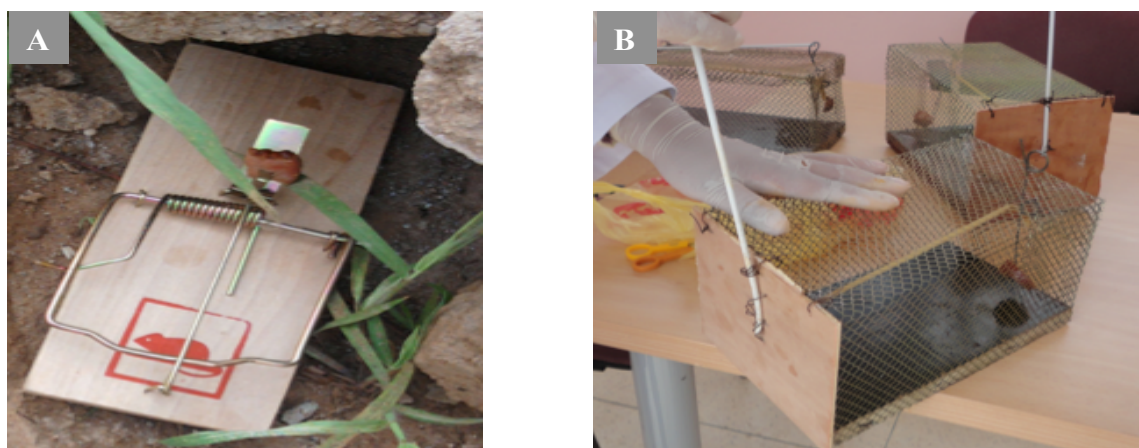


Figura 3.1. Armadilhas utilizadas no estudo: A – ratoeira em guilhotina ou gancho; B – armadilha tipo *Tomahawk*[®]
(Fotos originais da autora)

3.2.3. Aspetos éticos

A captura de roedores comensais, foi decidida e analisada em termos éticos à luz do plano integrado de controlo de pragas e roedores praticado em Angola, tal como acontece em outros países, objetivando o saneamento básico e a prevenção de doenças (BRASIL, 2002, PORTUGAL, 2012). Especificamente, para a prevenção da leptospirose, a

OMS recomenda a redução da população de roedores (ratos) num conjunto de medidas preventivas da doença (WHO, 2003).

Para obtenção das amostras biológicas foi seguido um protocolo cujos procedimentos obedeceram às normas de bem-estar animal assim como a princípios de ética em experimentos com animais, em vigor no LLBL/ HMT-UNL. Adicionalmente, foram consultados *guidelines* internacionais da OMS e de alguns investigadores, entre os quais Herbreteau e col., (2011) sobre a extração de amostras biológicas a partir de roedores cumprindo-se igualmente, apesar das limitações existentes, as regras de biossegurança necessárias por parte do pessoal interveniente (WHO, 2007, HERBRETEAU *et al.*, 2011).

3.2.4. Atividade laboratorial (em Luanda e Huambo)

- **Identificação de roedores ao nível da espécie**

A identificação da espécie dos roedores capturados, foi efetuada com o apoio de dos médicos veterinários do Serviço de Patologia bem como do pessoal adstrito ao Laboratório Regional de Luanda e do Huambo, respetivamente, ambos pertencentes ao Instituto de Investigação Veterinária do Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas de Angola.

Procedeu-se ao registo escrito e fotográfico dos dados morfométricos dos animais com base na comparação com parâmetros morfométricos publicadas em manuais técnicos (BRASIL, 2002, BONVICINO *et al.*, 2008, HERBRETEAU *et al.*, 2011), tal como vemos na Tabela 3.1.

Utilizaram-se para tal, instrumentos de medição como: fita métrica, balança digital de uso em laboratório assim como câmara fotográfica comum. Foram anotados os dados relativos ao tamanho da orelha em relação à cabeça, aspeto do focinho, côr da pelagem e sexo do animal.

Os dados foram inseridos na planilha (SPSS) correspondendo à informação de cada animal incluindo data de captura, local e meios utilizados.

Tabela 3.1. Características de três géneros de roedores comensais pertencentes à família Muridae, sub-família Murinae.

(Adaptado de Bonvicino e col., 2008)

CARATERÍSTICAS	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>R. rattus</i>	<i>Mus musculus</i>
Comprimento da cauda maior que o corpo		✓	✓
Comprimento da cauda menor que o corpo	✓		
Hábitos terrestres		✓	✓
Hábitos semi-aquáticos	✓		
Orelhas longas e nuas		✓	✓
Orelhas pequena e pilosas	✓		
Pelagem dorsal castanho escurae e ventral branca/cinza	✓	✓	
Pelagem castanha uniforme			✓
Tamanho pequeno (adulto), massa corporal 10-24gr			✓
Tamanho médio (adulto), massa corporal 20-100gr		✓	
Tamanho grande (adulto), massa corporal >100gr	✓		

Os procedimentos para identificação da espécie (Figura 3.2) como parte integrante do trabalho de campo, foram realizados nas instalações dos referidos Laboratórios Regionais de Luanda e do Huambo.

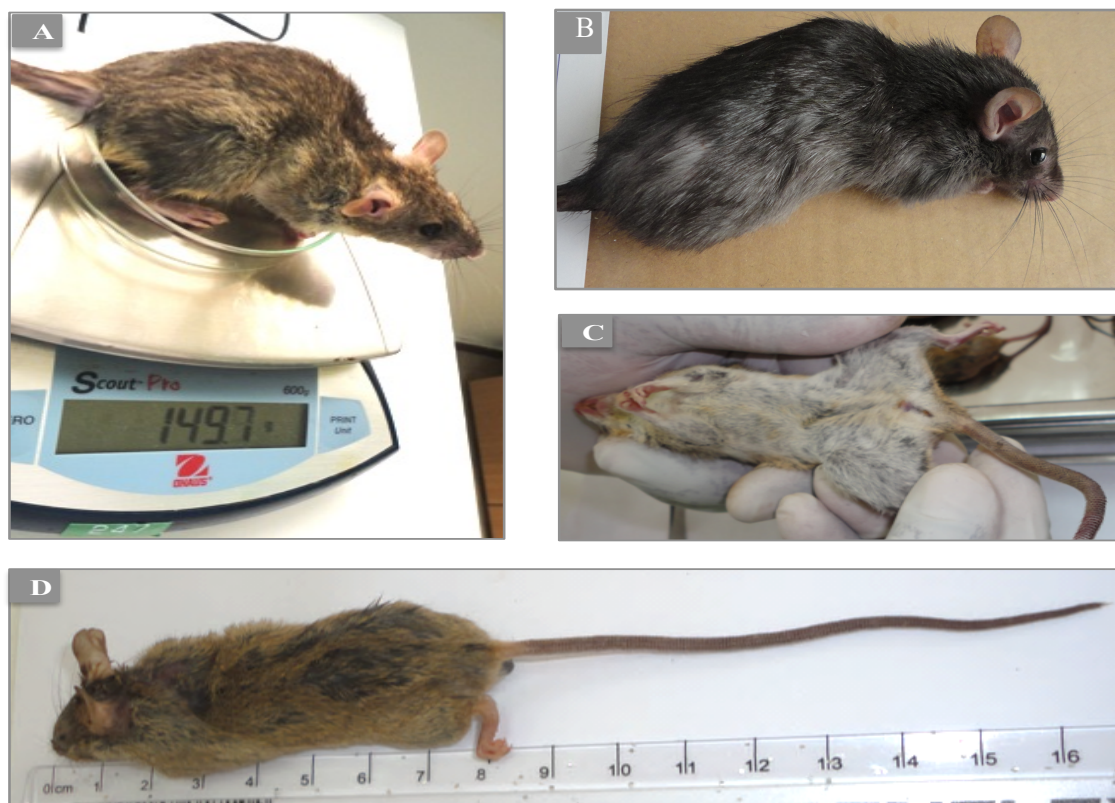


Figura 3.2. Fotografias das etapas de identificação dos roedores capturados. A - pesagem; B - características físicas do roedor (focinho e orelhas); C - sexagem; D - medição do comprimento.

(Fotos originais da autora)

Os roedores capturados vivos foram eutanasiados através da inalação de éter etílico (Figura 3.3A), comumente empregue como anestésico. Após desinfecção da região ventral, foi feita a incisão na linha médio ventral para aceder aos rins e ao coração (Figura 3.3B).

Com o animal ainda anestesiado, foi feita a punção cardíaca para recolha de sangue para tubo seco. Os tubos foram deixados em repouso até à retração do coágulo, procedimento que permitiu a separação do soro. As amostras obtidas foram de seguida congeladas a -20°C .

Foi feita a excisão do par de rins de cada animal (Figura 3.3C). Um dos rins foi colocado em tubo *ependorf*[®] e posteriormente congelado a -20°C destinado a análise laboratorial. O outro rim foi colocado em saco estéril, destinado à preparação para a cultura.

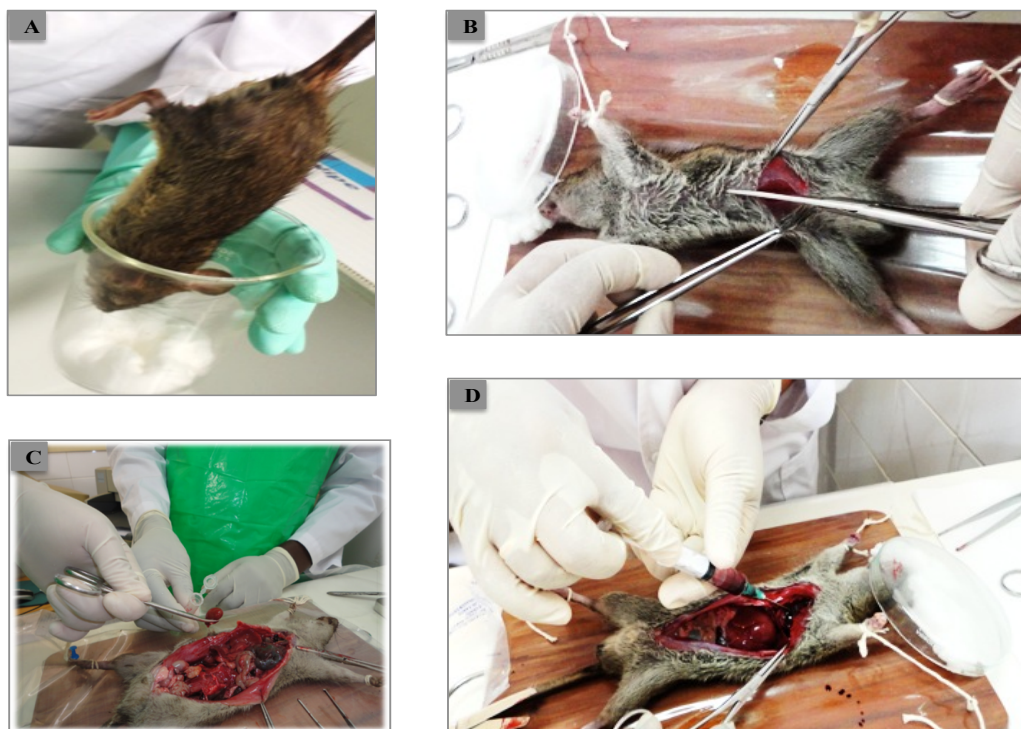


Figura 3.3. Etapas da obtenção das amostras nos roedores. A - inalação de éter etílico; B - incisão do abdómem; C - extração dos rins; D - punção cardíaca.

(Fotos originais da autora)

As carcaças dos animais resultantes das necropsias, assim como o material descartável, foram ao fim do dia submetidos a incineração utilizando-se fornos apropriados, ou queimados ao ar livre quando as instalações do laboratório não dispunham de equipamento de incineração (Figura 3.4).



Figura 3.4. Incineração das carcaças e outros resíduos após colheita de material biológico: A - utilização do incinerador no Huambo; B – destruição (por queima) ao ar livre em Luanda.

(Fotos originais da autora)

As amostras, na sua totalidade, incluindo rins e soros congelados (-20°C) e também tubos de cultura em meio de EMJH semissólido (mantidos à temperatura ambiente) foram transportadas para o LLBL (IHMT-UNL) em Lisboa, devidamente acondicionadas atendendo às condições de temperatura e outras para a respetiva conservação.

Simultaneamente, foi ainda providenciada a indispensável documentação para apresentação junto às Autoridades Alfandegárias e Sanitárias quer à partida de Angola, quer à chegada a Portugal.

- **Cultura do Tecido renal em meio seletivo**

Esta etapa realizou-se logo a seguir à excisão do tecido renal, em condições de assepsia e com o bico de *Bunsen* aceso; procedeu-se à sementeira de tecido renal em meio de cultura da seguinte forma: um dos rins foi coletado para um saco *Stomacher*[®] contendo 10 ml de meio líquido de *Ellinghausen McCullough Johnson and Harris* - EMJH (Difco[™] Sparks, MD 21152 USA), enriquecido (Figura 3.5B); a seguir o tecido renal foi homogeneizado através de maceração manual com ajuda de um bastão rombo (Figura 3.5C).

A suspensão foi mantida em repouso durante duas horas e a seguir efetuou-se a inoculação de 1ml do sobrenadante do macerado para cada um dos dois tubos (tubo A) contendo EMJH líquido (3,5ml) (Figura 3.5E).

Depois de uma hora repetiu-se o procedimento (repicagem) para um novo tubo de EMJH líquido (tubo B). Desta última suspensão foram retiradas dez a doze gotas para inocular em meio seletivo de EMJH semi-sólido (3,5ml). O total do meio de cultura utilizado (líquido e semi-sólido) era proveniente do stock do LLBL, (HMT), o qual foi mantido em condições ótimas de temperatura (4°C).

Todos os preparados de cultura (Figura 3.5F), foram colocados numa estufa (disponível no local) à temperatura de 28-30°C e sujeitos a agitação manual diária.

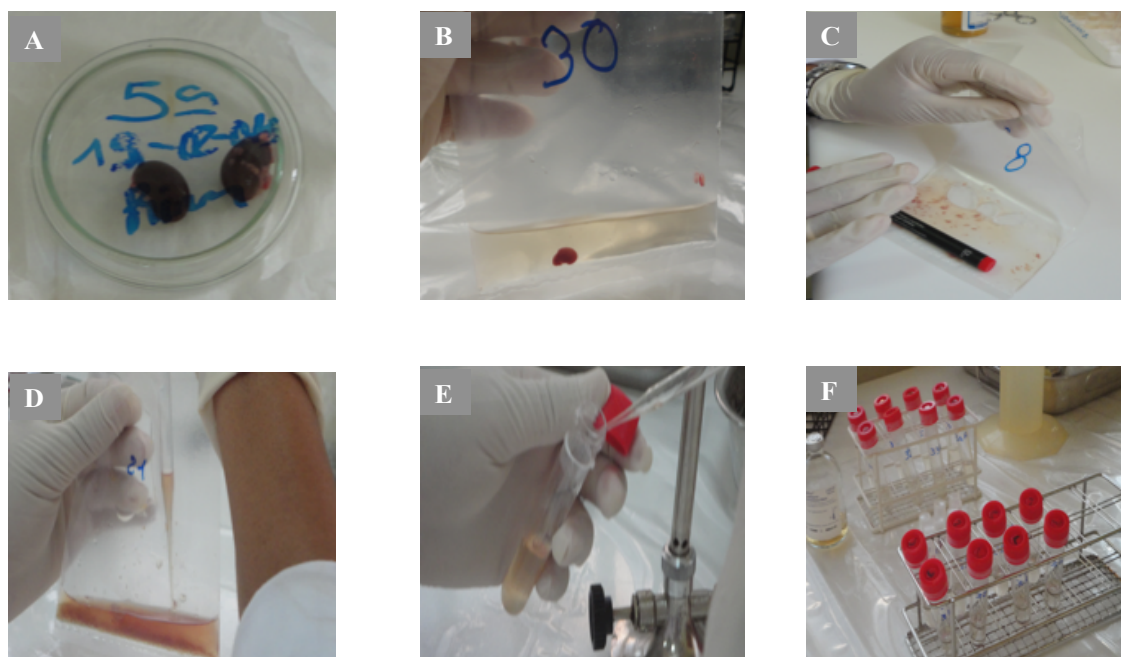


Figura 3.5. Processo de preparação do tecido renal para a cultura em meio seletivo de EMJH: A - rins logo após a extração; B - tecido renal em saco hermético (*Stomacher*[®]); C - maceração do tecido renal; D - pipetagem do homogeneizado; E - sementeira; F - tubos com as culturas prontas para incubação (em incubadora orbital a 29°C).

(Fotos originais da autora)

Já no laboratório de referência em Lisboa (HMT), os tubos de meio contendo tecido renal preparados no decurso do trabalho de campo foram colocados numa incubadora orbital a 29°C, com agitação permanente e visualizados após 15 dias de incubação em microscópio de fundo escuro. Os tubos nos quais se confirmou o crescimento de leptospiros, também demonstrado pela presença do ‘anel de *Dinger*’, foram sucessivamente sub-cultivados para novo meio seletivo de EMJH semi-sólido e para meio EMJH líquido em intervalos de 10-15 dias.

A cada período de mais ou menos 30 dias procedeu-se a passagens “cegas” das culturas para outros (novos) tubos de meio estéril e que se mantinham negativas, pela indispensável observação ao microscópio de fundo escuro para confirmar a presença ou não de leptospiros ou detetar possíveis contaminações. Ao fim de 90 dias os tubos com ausência de crescimento foram descartados.

3.2.5. Caracterização dos isolados de *Leptospira* spp

Para a tipificação dos isolados, foi preparado um par de tubos de culturas frescas, com até 10 dias de incubação e com crescimento suficiente ou densidade de 2×10^8 células/ml. Estas culturas correspondiam aos isolados e aos controlos, sendo estes últimos, culturas de referência dos complexos *L. interrogans* s.l. dos seguintes serovares/ estirpes: Icterohaemorrhagiae/ RGA; Copenhageni/ M20; Ballum/ Arborea; Ballum/ Mus127 e o serovar/ estirpe Patoc/ PatocI, representante do complexo de espécies saprófitas *L. biflexa* s.l.

- **Testes fenotípicos**

Estes testes tiveram como objetivo diferenciar espécies patogénicas das saprófitas, utilizando-se as culturas dos isolados e as de referência como controlos. O método consiste em submeter as culturas a condições específicas e avaliar padrões de crescimento e de alterações morfológicas das leptospiros.

Tais condições são: crescimento sob incubação a 13°C (JOHNSON AND HARRIS, 1967); crescimento após adição de 8-azaguanina (225µg/ml) (JOHNSON AND ROGERS, 1964) e sob adição de NaCl 1M (AURAN *et al.*, 1972), sabendo-se que apenas as leptospiros saprófitas resistem a estas provas mantendo um crescimento contínuo e considerado normal.

Teste de crescimento de Leptospira spp com e sem adição de 8-azaguanina (225µg/ml)

Com as culturas jovens (máx.10 dias) e densas (2×10^8 cel./ml), retirou-se 1ml de cada uma e a seguir inoculou-se em dois tubos, um contendo meio EMJH líquido (3,5ml) e outro, com meio EMJH líquido (3,5ml) adicionado de 225µg/ml de 8-azaguanina e ambos foram incubados a 29°C.

Foram observadas e registadas as características de crescimento através da visualização macroscópica e também microscópica (microscópio de fundo escuro) a cada três dias, durante 15 dias.

Teste de crescimento sob temperatura de 13°C e de 29°C

Para este teste, foi inoculado 1ml de cada cultura para dois tubos contendo 3,5ml de meio EMJH líquido e a seguir colocados um tubo numa estufa a 13°C e outro tubo numa estufa a 29°C durante 15 dias. Foi efetuada observação macroscópica e microscópica a cada três dias para se verificar o padrão de crescimento.

Teste de alterações morfológicas com e sem adição de 1 M NaCl

Para este teste, foi retirado 1ml de cada tubo de cultura (máx.10 dias e 10^8 cel./ml) que foi centrifugado a 10.000 RPM durante 4 min à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1ml de uma solução 1M de NaCl, misturando-se muito bem em cada tubo. A seguir, colocaram-se as amostras à temperatura ambiente durante 2-3 horas e observou-se em microscópio de fundo escuro para verificar o surgimento de formas esféricas, reação compatível com estirpes patogénicas.

- **Testes Serológicos**

Para estes testes foi utilizada uma variante da Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM), para determinar o serogrupo e o serovar de cada ‘novo’ isolado de *Leptospira*. Foram empregues os isolados e os serovares/estirpes de serogrupos conhecidos provenientes da bateria de referência nomeadamente dos serogrupos Icterohaemorrhagiae, serovar (sv) Copenhageni/ M20, Icterohaemorrhagiae sv Icterohaemorrhagiae/ RGA; Ballum sv Arboreae e Ballum sv Ballum/ Mus127. Todas as culturas foram mantidas em meio EMJH líquido com tempo de crescimento não inferior a 10 dias e com densidade de 10^8 cel./ml.

Os ‘novos’ isolados a serem identificados, bem como os controlos, serviram de antígeno para a reação com os anticorpos, que neste caso eram conhecidos. Assim, para determinar o serogrupo ‘presuntivo’, utilizaram-se soros hiperimunes e para determinar o serovar ‘presuntivo’ utilizaram-se soros contendo anticorpos monoclonais.

Utilização de soros hiperimunes

Os soros hiperimunes (obtidos de coelho) disponíveis no laboratório, foram preparados e adquiridos ao Centro de Referência para Leptospirose em Amsterdão (*Royal Tropical Institute/ Koninklijk Institute vorr de Tropicen - KIT*). Cada um dos referidos soros é dirigido a um determinado serogrupo, pelo que tem características de reatividade específica.

O teste baseia-se na metodologia da Técnica de Aglutinação Microscópica (Figura 3.6), utilizando-se os soros hiperimunes previamente diluídos a 1:20 que se fazem reagir com os antígenos que neste caso eram os ‘novos’ isolados e os controlos. O resultado positivo advém da comparação recíproca entre o título de anticorpos obtido pelos isolados e o título de anticorpos expresso pelas culturas de referências (serovares conhecidos) (POSTIC *et al.*, 2000, WHO, 2003).

Utilização de anticorpos monoclonais

Por sua vez, os anticorpos monoclonais permitem comparar os títulos obtidos pela reação de aglutinação entre os antígenos (serovares conhecidos da bateria de referência e os ‘novos’ isolados) e a respetiva bateria de anticorpos monoclonais. Diferenças no valor dos títulos de aglutinação obtidos poderão indicar o serovar ‘presuntivo’ (WHO, 2003).

Para identificação ‘presuntiva’ do serovar, foi realizada a TAM conforme protocolo padrão (Figura 3.6), utilizando-se anticorpos monoclonais (mAbs) adquiridos ao KIT-Amsterdão. Estavam disponíveis no laboratório para este ensaio, os mAbs com os seguintes códigos: F12C3-10; F52C1-3; F70C24-15; F70C7-11; F89C12-4, que correspondiam ao serogrupo *Icterohaemorrhagiae* e F74C1-4, F74C4-4 e F74C7-3 que correspondiam ao serogrupo *Ballum*.

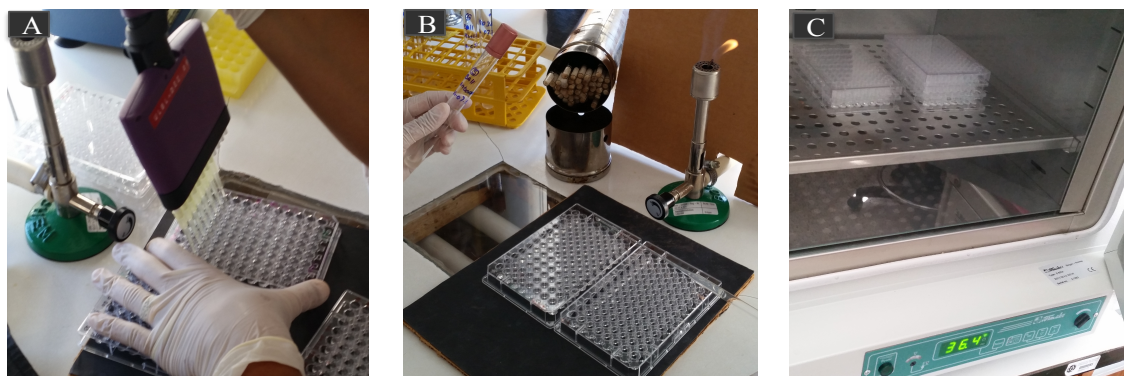


Figura 3.6. Algumas das etapas da execução da técnica de aglutinação microscópica utilizando anticorpos monoclonais: A - diluição seriada dos soros; B - pipetagem da cultura de *Leptospira* spp; C- incubação em estufa a 37°C.

(Fotos originais da autora)

- **Testes moleculares (PCR)**

Ensaio com os primers Hap 1

Foi previamente extraído o DNA com a utilização do kit comercial da CITOGENE[®] (Citomed-Lisboa, Portugal) mediante o protocolo específico para extração de DNA de bactérias Gram (-) a partir de cultura. A PCR teve como alvo o gene *hap1*, presente em todas as espécies patogénicas de *Leptospira* e que amplifica um fragmento de 262pb. O referido produto foi depois sequenciado pela empresa STABVIDA-Lisboa, Portugal e o resultado desta sequenciação (as sequências nucleotídicas) foi analisado no programa BLAST/ NCBI (*Basic Local Alignment Search Tool/ National Center for Biotechnology Information*) para se conhecer a percentagem de similaridade do DNA com genospecies registadas e depositadas no *GenBank*.

Ensaio com o primer iRep1

Para determinar o serogrupo por abordagem molecular, foi utilizada a técnica PCR-iRep1, descrita por Barocchi (2001) que compara os perfis eletroforéticos resultantes da amplificação do DNA leptospírico de cada um dos serovares representantes dos diferentes serogrupos conhecidos de *Leptospira* spp. Utilizou-se a bateria de 24 serovares de referência, representativa de 19 serogrupos e ainda os ‘novos’ isolados também mantidos em culturas, dos quais foi extraído o DNA com a utilização do kit da CITOGENE[®].

Após a separação eletroforética em gel de agarose nas condições já descritas (cf. Estudo 1, pág. 54) foram comparados os perfis através da visualização do gel no equipamento de análise de imagem “Dolphin -1D”, utilizando software Wealtec[®].

3.2.6. Análise dos soros de roedores pela TAM

Das amostras de sangue obtidas por punção cardíaca nos roedores, foi feita a separação do soro de cada uma das amostras as quais foram submetidas à TAM para detecção de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l. Por se tratar de roedores foram consideradas positivas as amostras cujo valor era igual ou superior ao título de aglutinação de 1:50.

3.2.7. Detecção de DNA de *Leptospira* spp em tecido renal e sequenciação

- **Extração de DNA do tecido renal**

Os rins preservados à temperatura de -20°C e pertencentes a cada um dos roedores capturados, foram individualmente seccionados longitudinalmente desde a parte cortical à parte medular afim de se obter uma porção de cerca de 0,02 gramas. Cada um destes fragmentos de tecido renal foi homogeneizado manualmente em tubo *eppendorf*[®] (1,5ml) contendo *Cell lyse Buffer*, com auxílio de pontas de micropipetas, Figura 3.7.

Proseguiu-se a extração de DNA, utilizando-se o kit comercial da CITOGENE[®] (Tissue kit) e respetivo protocolo. O produto da extração obtido foi diluído para uma concentração de 1:10 tendo-se obtido uma concentração de DNA de 180ng/μl, medida no equipamento Nanodrop[®] ND 1000 Coleman Technologies, Inc. PA, USA.



Figura 3.7. Etapas da preparação do tecido renal para extração de DNA leptospírico: A- corte de fragmento; B - pesagem; C – maceração manual.

(Fotos originais da autora)

- **Amplificação de DNA leptospírico e sequenciação dos amplicões**

A PCR foi realizada tendo como alvo o gene *hap1* que codifica a proteína associada à hemolisina, presente nas proteínas de superfície da membrana externa das leptospiras patogénicas.

Previamente aos ensaios com as amostras, foram feitos testes para determinar a sensibilidade dos *primers* utilizando-se diluições seriadas de uma cultura (serovar/estirpe) de leptospiras patogénicas da bateria de referência. O resultado obtido está ilustrado na Figura 3.8.



Figura 3.8. Teste de sensibilidade da PCR com os *primers* Hap1, utilizando-se uma cultura (serovar/estirpe) de *L. interrogans* s.l., serovar Ballum/ M127. Diluições: 1 - 10^8 ; 2 - 10^7 ; 3 - 10^6 ; 4 - 10^5 ; 5 - 10^4 . M – marcador molecular de 100-1000 pb.

O DNA amplificado a partir das amostras de tecido renal dos roedores, foi sequenciado pela empresa STABVIDA, em Lisboa (Portugal). A similaridade das seqüências nucleotídicas foi calculada através do programa (BLAST[®]/ NCBI), USA (NCBI, 2013).

3.2.8. Análise filogenética

As seqüências de nucleótidos do DNA amplificado a partir dos isolados então obtidos, foram previamente registadas no *GenBank*, através do website www.ddbj.nig.ac.jp/wp-content. O agrupamento (*clustering*) e alinhamento (*alignment*) destas seqüências foram conseguidos através do acesso à plataforma do *European Molecular Biology Laboratory /European Bioinformatic Institute*, através do site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2ClustalW2/EMB/EBI>.

A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 6, usando-se o método *neighbor-joining*, modelo Jukes Cantal e representado com o teste de confiança de 1000 *replicates* com um *cut off* de 50% (TAMURA *et al.*, 2013).

3.2.9. Análise estatística dos dados

A análise estatística foi efetuada partir de uma base de dados preparada para o presente trabalho, com recurso ao programa SPSS[®].

Os dados relativos aos roedores incluíram o local de captura, parâmetros morfométricos e os resultados laboratoriais, classificados como variáveis independentes qualitativas (nominais e ordinais) e quantitativas (ex. peso, e dimensão corporal), respetivamente.

Efetuaram-se os cálculos de frequência relativa e absoluta e construíram-se os gráficos e tabelas utilizando-se as ferramentas do *Microsoft Office* (Windows[®]).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Área do estudo e população de roedores

Um total de 77 roedores foram capturados em 18 localidades situadas nas zonas urbanas, peri-urbanas e rurais, tendo sido diferenciados pelo habitat do animal em:

próximo de lixeiras, o interior das habitações e, em campo aberto.

A área onde se realizaram as capturas corresponde a uma distância de 14.000 metros a partir do centro da cidade, em Luanda (Figura 3.9A) e 2.000 metros no Huambo (Figura 3.9B) calculados através de ferramentas de mapeamento do programa *Google Earth* (GOOGLE, 2012).

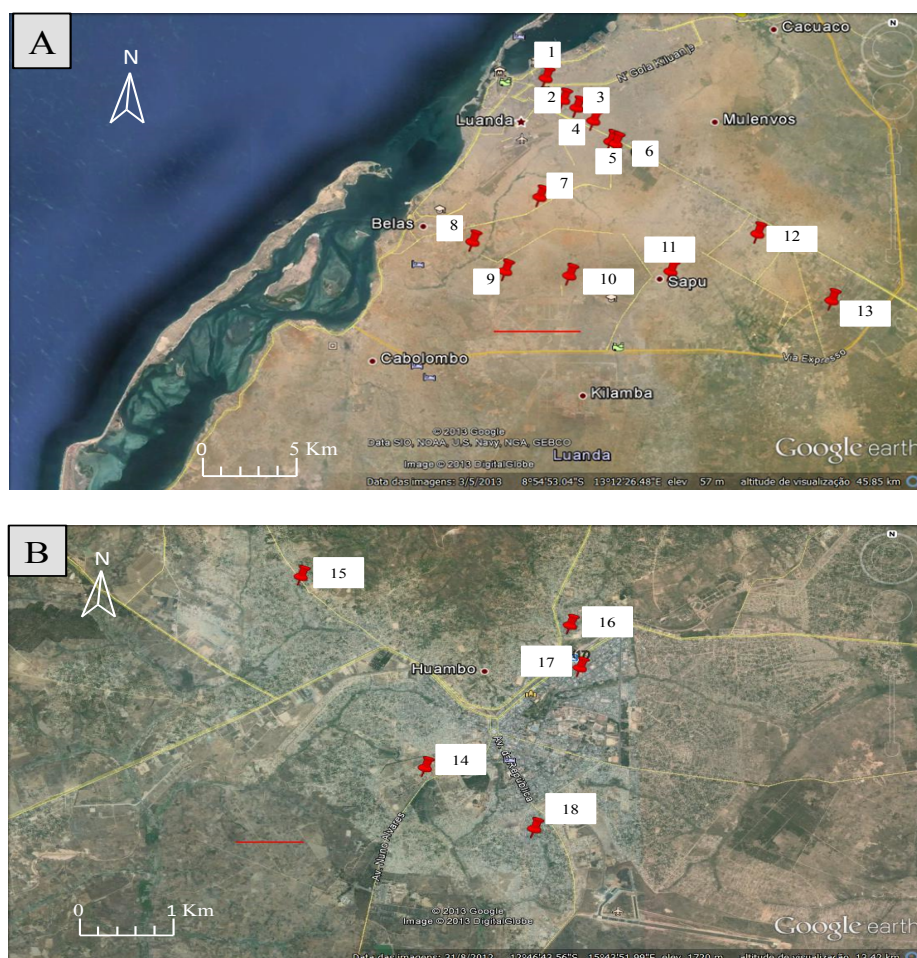


Figura 3.9. Vista satélite dos locais de captura dos roedores. A - Luanda: (1) São Paulo; (2) Macambira; (3) Congolenses; (4) Neves Bendinha; (5) Palanca; (6) Capolo; (7) Golf 2; (8) Talatona; (9) Camama; (10) Fubu; (11) Sapu; (12) Viana; (13) Zango; B - Huambo: (14) Calomanda; (15) Munda; (16) Benfica; (17) Baixa; (18) Capango.

Foram utilizadas cerca de 150 armadilhas colocadas durante ambas as estações: estação seca, de Abril a Maio de 2012 e na estação chuvosa de Janeiro a Fevereiro de 2013.

Em Luanda foram capturados 60 roedores dos quais 20 com armadilhas tipo Tomahwak[®] os quais foram mantidos vivos e os restantes 40 capturados com armadilhas letais. Já no Huambo foram capturados apenas 17 animais vivos entre ratos e camundongos. Os pequenos mamíferos eram predominantemente adultos fêmeas (Tabela 3.2). O fluxograma da Figura 3.10, mostra os animais selecionadas para cada etapa da análise, adiantando-se que apenas as amostras frescas foram viáveis para cultura em meio seletivo.

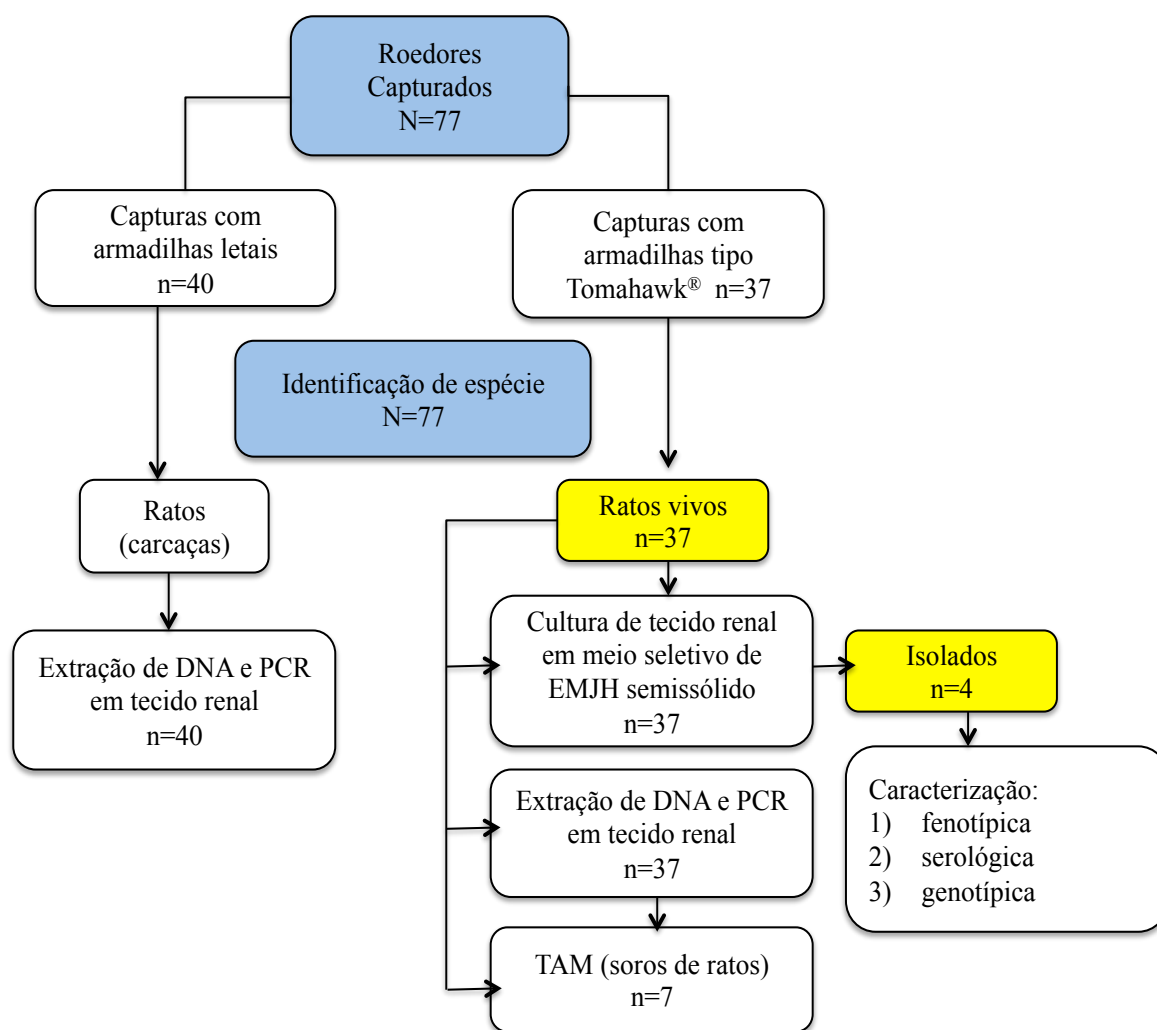


Figura 3.10. Fluxograma do resultado da seleção das amostras para os distintos procedimentos laboratoriais.

- **Identificação dos roedores**

O total de pequenos mamíferos capturados em ambas as Províncias N=77, foram classificados em três espécies: *Rattus rattus* [$n_{Rr}=50$ (55,5%)]; *R. norvegicus*, [$n_{Rn}=23$ (25,6%)] e *Mus musculus* [$n_{Mm}=17$ (18,9%)] que também são denominados com os nomes populares de ‘rato preto’, ‘rato castanho ou ratazana’ e ‘rato do telhado’ ou ‘ratinho caseiro’, respetivamente (Tabela 3.2).

A população de roedores foi constituída maioritariamente por fêmeas [$n_{\text{♀}}=42$ (54,5%)] das quais seis (6), 14,3% estava prenhe, sendo os machos [$n_{\text{♂}}=35$ (45,5%)].

Tabela 3.2. Identificação dos roedores capturados nas duas Províncias.

Espécies	Maturidade e sexo		Províncias	TOTAL (%)
	Adultos	Juvenis		
	machos/fêmeas	machos/fêmeas		
<i>Rattus norvegicus</i>	4/0	9/8	Luanda	21 (27,3)
<i>Rattus rattus</i>	7/17	10/9	Luanda e Huambo	13 (16,9)
<i>Mus musculus</i>	1/4	4/4	Luanda e Huambo	43 (55,8)
TOTAL	12/21	23/21		77 (100)

Quando distribuímos a população de roedores pelos locais de captura, observamos que a espécie *R. norvegicus* foi predominante em Luanda enquanto que no Huambo, o maior número foi da espécie *M. musculus* tal como mostra a Figura 3.11.

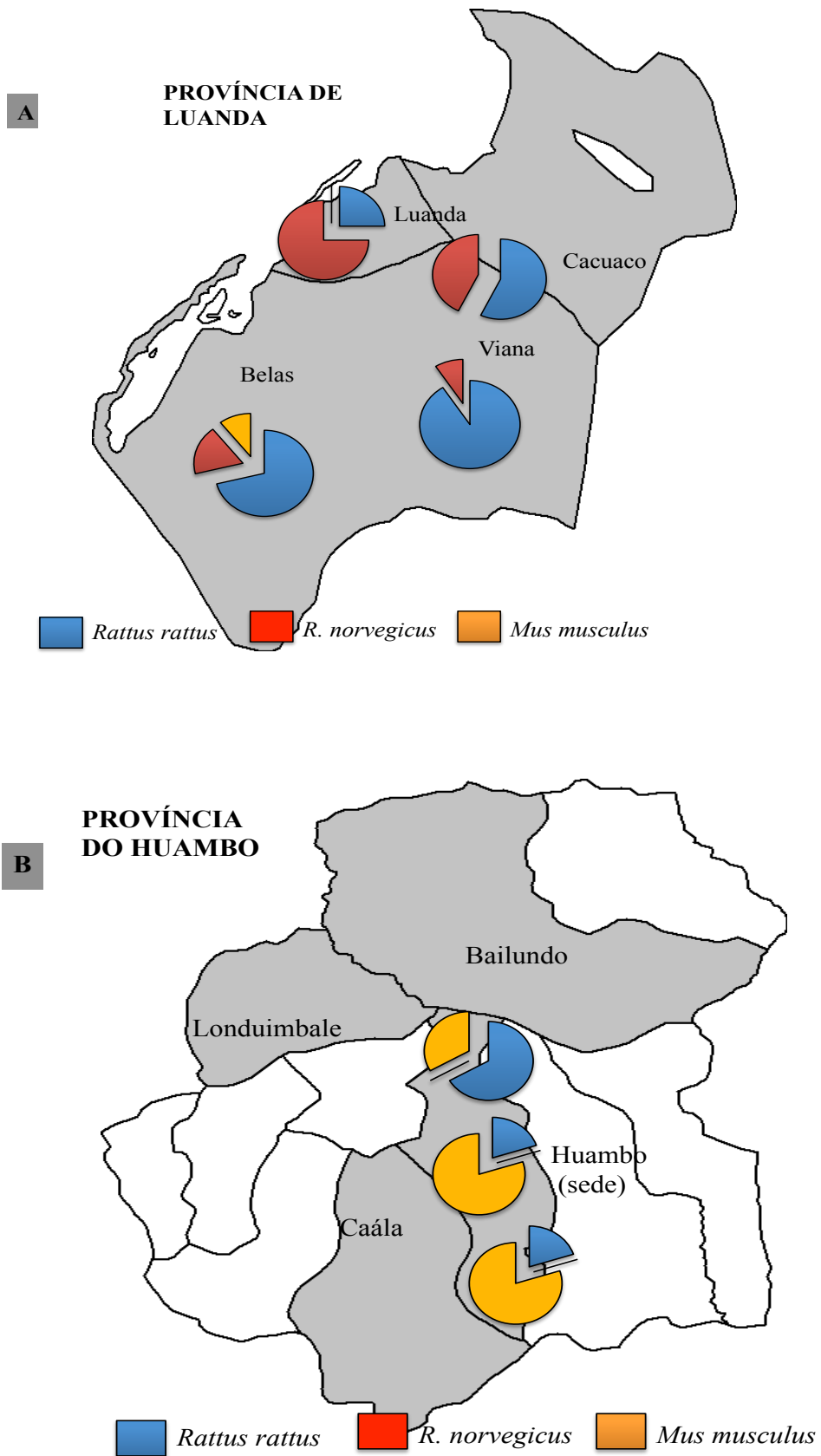


Figura 3.11. Representação geográfica da distribuição das espécies de roedores capturadas nas Províncias de Luanda (A) e do Huambo (B).

3.3.2. Cultura do tecido renal / obtenção de isolados

A cultura de tecido renal de 37 roedores vivos, resultou em quatro (11%) isolados de *Leptospira* spp depois de duas semanas de incubação. As amostras positivas designadas por LDA02, LDA05 e LDA10, correspondem a três roedores da espécie *R. norvegicus*, capturados em Luanda e a amostra HBO34 corresponde a um roedor da espécie *M. musculus*, capturada no Huambo. As culturas observadas a olho nu e ao microscópio de fundo escuro, mostraram características típicas de motilidade e morfologia compatíveis com espiroquetas do género *Leptospira* (Figura 3.12).

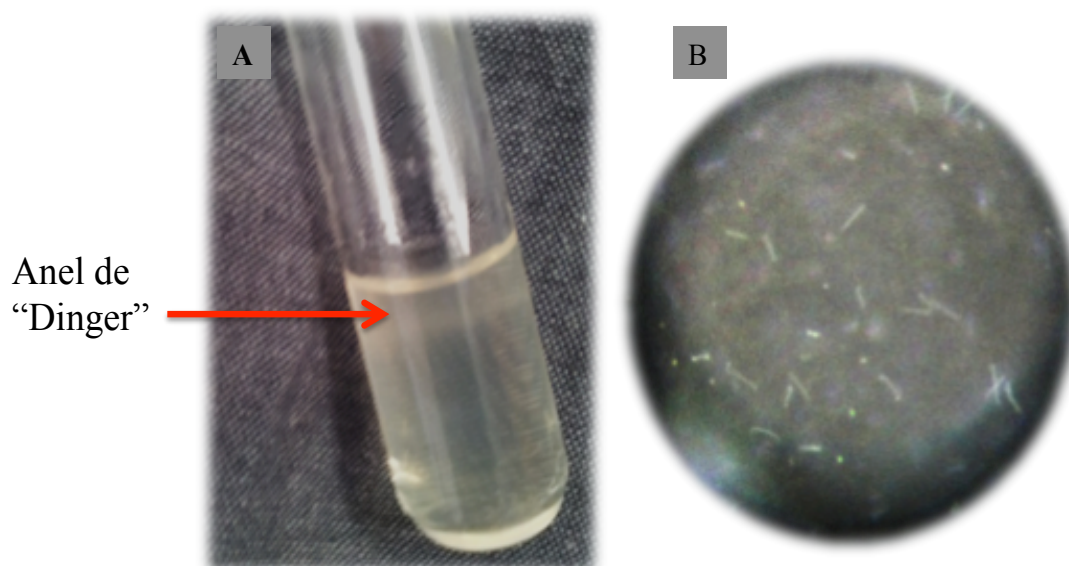


Figura 3.12. Aspeto de uma cultura dos ‘novos’ isolados de *Leptospira* spp A - imagem macroscópica da cultura mostrando o “anel de Dinger”; B - imagem da cultura em microscópio de fundo escuro (objetiva 20x).

- **Caracterização dos ‘novos’ isolados**

Características fenotípicas

Quando comparado o padrão de crescimento, à temperatura de 13°C, observou-se inibição do mesmo nos ‘novos’ isolados assim como nas culturas de serovares patogénicos utilizadas como controlo, ao contrário do serovar PatocI (saprófito) que

manteve crescimento normal. Este mesmo resultado, foi também observado face à adição de 8-azaguanina na concentração de 225µg/ml.

Com a adição de uma solução 1M de NaCl nas culturas, os ‘novos’ isolados e o serovar/ estirpe Copenhageni/ M20 mostraram alterações na sua morfologia, apresentando formas esféricas e redução do tamanho, diminuição da motilidade e o aparecimento de um sedimento no fundo do tubo.

Observou-se diferente resposta da parte do serovar/ estirpe (Patoc/ PatocI) representante da espécie saprófita de *Leptospira* que manteve a sua morfologia normal. Os resultados obtidos nos referidos testes fenotípicos mostraram que os ‘novos’ isolados têm características semelhantes às estirpes patogénicas, utilizadas como controlos, tal como se observa na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Resultado dos testes fenotípicos: crescimento parcialmente inibido (+); crescimento normal (+++); S - sim (forma esférica); N - não (normal); Ictero.- Icterohaemorrhagiae.

TESTES	Leptospiras patogénicas				Leptospiras saprófitas	
	LDA02	LDA05	LDA10	HBO34	Ictero. Copenhageni (M20)	Patoc (PatocI)
Temperatura de 13°C	+	+	+	+	+	+++
Adição de 8-azaguanina (225µg/ml)	-	-	-	-	-	+++
Reação em solução de 1M NaCl	S	S	S	S	S	N

- **Características dos isolados (por serologia)**

Com a realização da TAM utilizando-se soros hiperimunes, obtiveram-se os títulos de aglutinação representados na Tabela 3.4.

As amostras correspondentes aos isolados LDA02, LDA05 e LDA10 foram reativas com os soros hiperimunes correspondendo ao serogrupo Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans* s.l., e a amostra correspondente ao isolado HBO34, reagiu com os soros hiperimunes do serogrupo Ballum.

Tabela 3.4. Títulos de aglutinação obtidos com a utilização de soros hiperimunes e respetiva origem.

SOROS HIPERIMUNES	ORIGEM	ISOLADOS			
		LDA02	LDA05	LDA10	HBO34
Canicola/Hond Utrech	Paris 1981	1:200	1:200	1:200	1:20
Copenhageni/M20	Holanda 1986	1:3200	1:3200	1:3200	1:20
Ictero./RGA	Holanda 1986	1:3200	1:1600	1:3200	1:20
Louisina /LSU1945	S/D	1:400	1:200	1:200	1:20
Javanica Poi /Poi	Holanda 1984	1:200	1:400	1:200	1:20
Celledoni/Celledoni	Hereford 1986	1:20	1:100	1:20	1:20
Tarassovi/Mitis Jhonson	S/D	1:20	1:20	1:20	1:20
Pyrogenes /Salinem	Paris 1981	1:20	1:20	1:20	1:100
Ballum /Mus127	Paris 1981	1:20	1:20	1:20	1:3200

- **Determinação do serovar**

A reação dos antígenios (isolados e culturas de referência) com os anticorpos monoclonais, revelou aglutininas anti-*L. interrogans* s.l., cujos títulos foram comparados com os serovares de referência. Os ‘novos’ isolados LDA02, LDA05 e LDA10, mostraram um padrão semelhante ao serovar/ estirpe Icterohaemorrhagiae (RGA) e o isolado HBO34 mostrou um padrão semelhante ao serovar Arboreae do serogrupo Ballum (Figura 3.13).

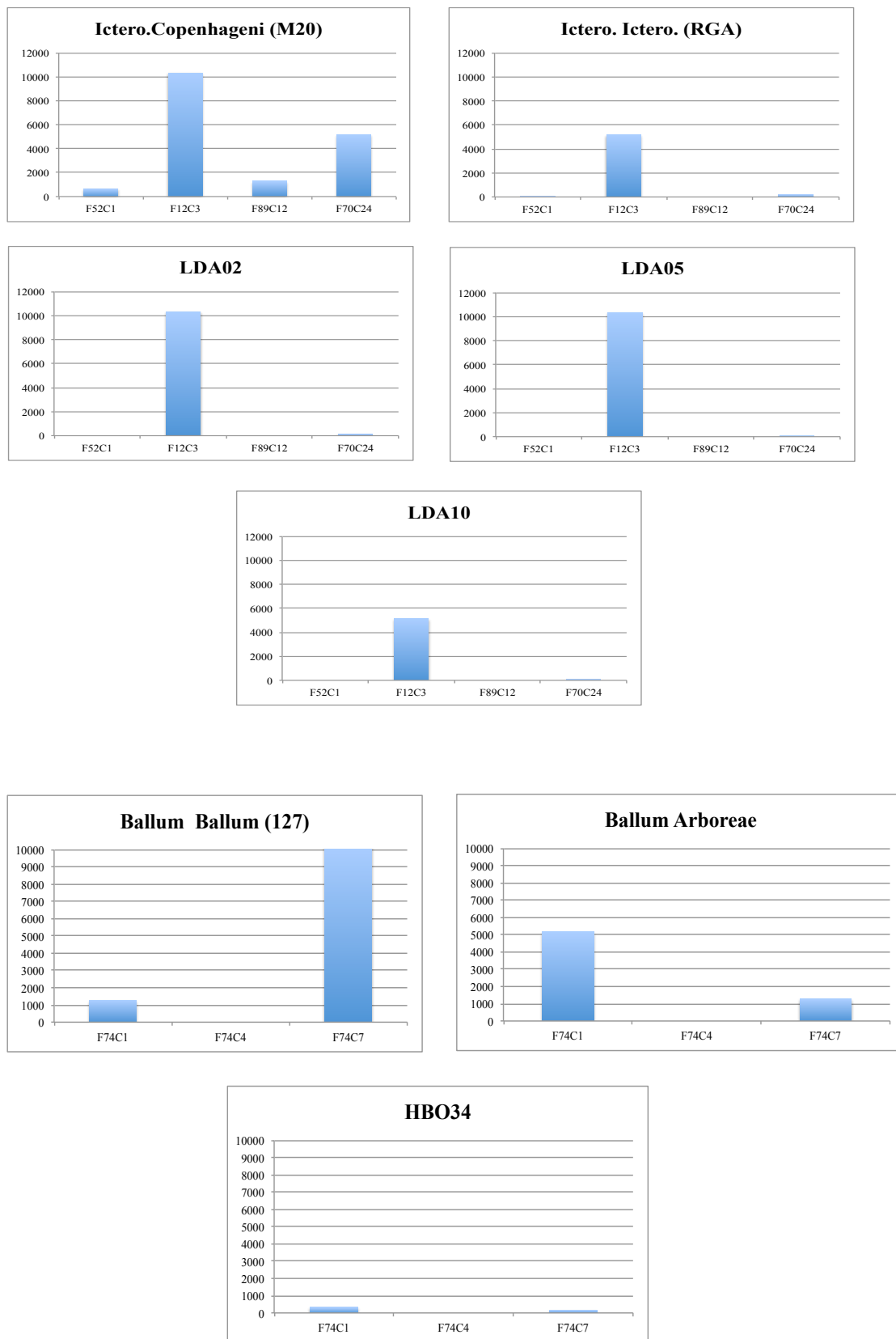


Figura 3.13. Representação gráfica dos títulos de aglutinação obtidos na reação da cultura dos ‘novos’ isolados (LDA02, LDA05, LDA10 e HBO34) com anticorpos monoclonais (mAbs), do serogrupo Ballum e Icterohaemorrhagiae.

- **Abordagens moleculares**

Amplificação de DNA de culturas dos isolados de *Leptospira* spp (primers Hap1)

O ensaio da PCR aplicado às culturas de isolados, tendo como alvo o gene *hap1*, resultou na amplificação de DNA leptospírico com amplificação do fragmento esperado de 262pb (Figura 3.14). As sequências nucleotídicas obtidas foram identificadas por sequenciação como *L. interrogans* sensu stricto (s.s.) correspondendo aos isolados LDA02, LDA05 e LDA10 e *L. borgpetersenii* correspondendo ao isolado HBO34.

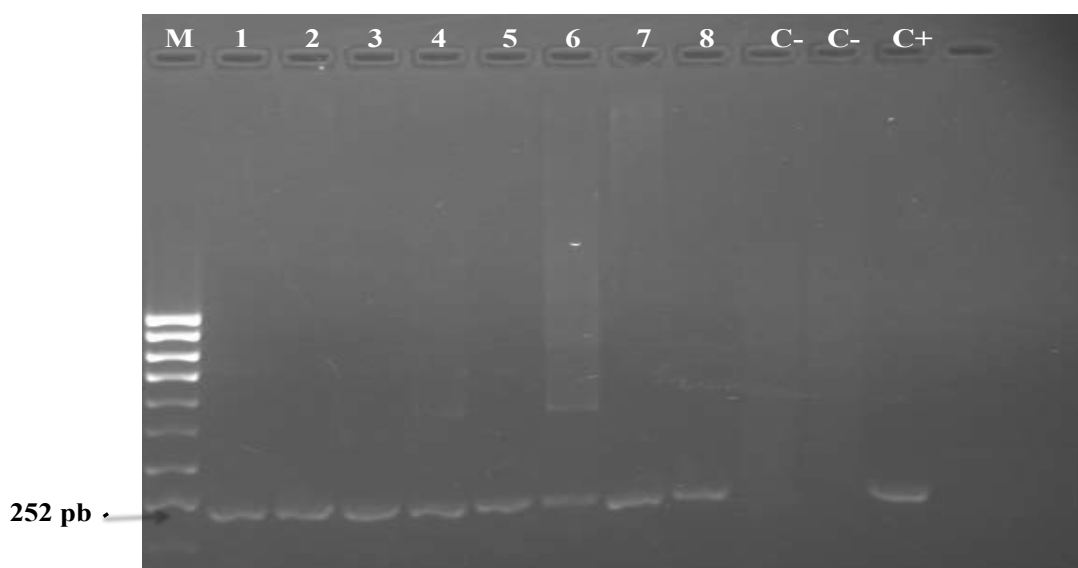
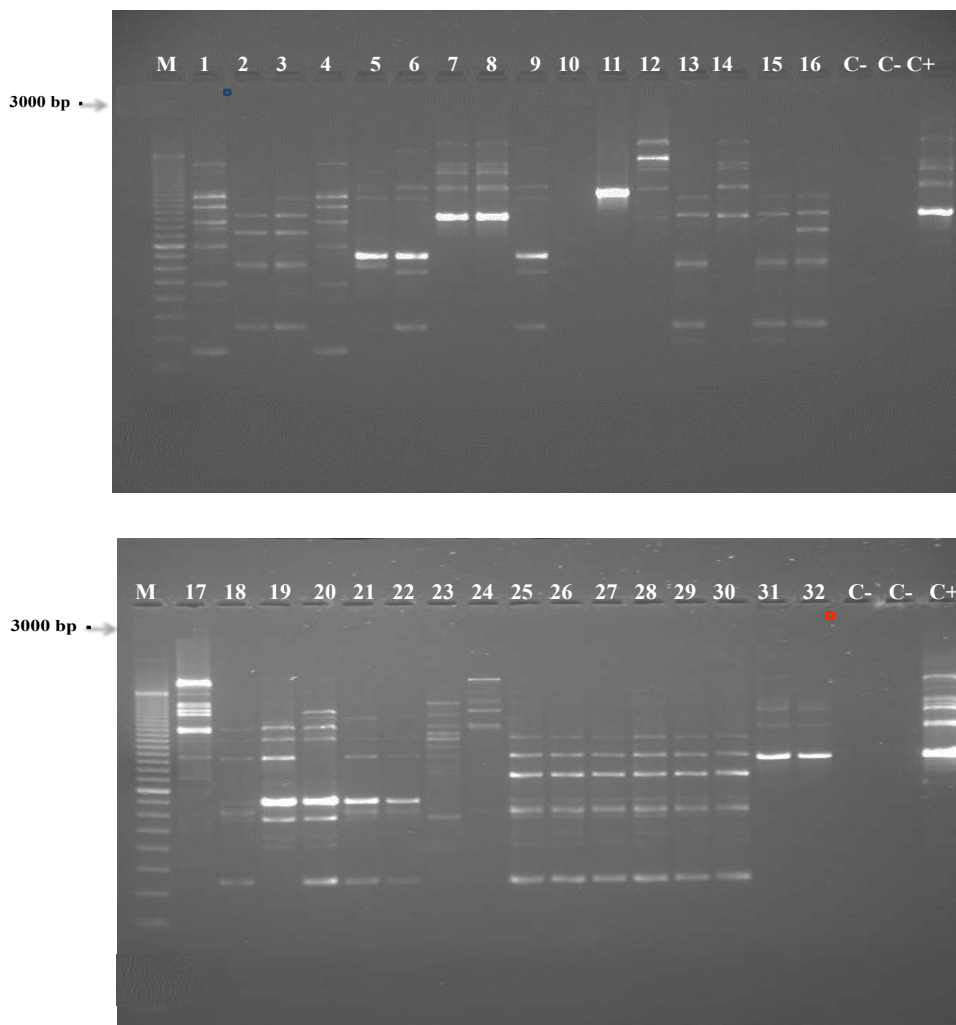


Figura 3.14. Fotografia do gel de agarose que revela o perfil eletroforético da amplificação do DNA leptospírico a partir dos isolados: (1-2) LDA02; (3-4) LDA05; (5-6) LDA10; (7-8) HBO34; (M) marcador molecular (100-1000pb); (C-) controlo negativo; (C+) controlo positivo;

Amplificação do DNA dos isolados e culturas de referência (primer iRep1)

As reações de PCR com o *primer* iRep1, revelaram semelhanças entre os perfis genómicos dos ‘novos’ isolados LDA02, LDA05 e LDA10 e os perfis dos serovares de referência representativos do serogrupo Icterohaemorrhagiae pertencente à espécie genómica *L. interrogans* s.s. Quanto ao isolado HBO34, foi encontrada semelhança entre o seu perfil eletroforético e os serovares representativos do serogrupo Ballum da genosepécie *L. borgpetersenii* (Figura 3.15).



Legenda A

- M – Marcador (100-3000pb)
- 01- Patoc Patoc1
- 02- Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA
- 03 – Icterohaemorrhagiae Copenhageni M20
- 04 – Pomona Mozdok 5621
- 05 – Grippytyphosa Valbuzzi Valbuzzi
- 06 – Canicola Canicola Hond Utrecht IV
- 07 – Ballum Arboreae Arborea
- 08 - Ballum Ballum Mus 127
- 09 – Sejroe Saxkoebing Mus 24
- 10 – Panama Panama CZ 214
- 11 – Cynopteri Cynopteri 3522
- 12 – Tarassovi Tarassovi Perepelicin
- 13 – Sejroe Wolffii 3705
- 14 – Mini Mini Sari
- 15 - Sejroe Hardjobovis Lely 607
- 16 – Sejroe Hardjo Hardjoprajitno
- C- - Controlo negativo
- C+ - Controlo positivo

Legenda B

- M – Marcador (100-3000pb)
- 17 – Javanica Poi Poi
- 18 – Pyogenes Pyogenes Salinem
- 19 – Australis Jês Bratislava Bratislava
- 20 – Hebdomadis Hebdomadis Hebdomadis
- 21 – Autumnalis Autumnalis Akiami A
- 22 – Bataviae Bataviae Van Tienem
- 23 – Celledoni Celledoni Celledoni
- 24 – Louisiana Lanka Louisiana
- 25 – LDA02A
- 26 – LDA02B
- 27 – LDA05A
- 28 – LDA05B
- 29 – LDA10A
- 30 – LDA10B
- 31 – HBO34A
- 32 – HBO34B
- C- - Controlo negativo
- C+ - Controlo positivo

Figura 3.15. Resultado da PCR-iRep1: fotografia do gel de agarose com os produtos amplificados a partir de serovares de *Leptospira interrogans* s.l., da bateria de referência e dos isolados. Cada perfil corresponde a um serogrupo diferente sendo os ‘novos’ isolados (25-32) comparados com os serovares de referência.

- **Registo no GenBank**

Após identificação e caracterização, as sequências nucleotídicas dos ‘novos’ isolados foram registadas no *GenBank* obtendo-se os seguintes números de acesso: **LC006258**, **LC006259**, **LC006260** classificadas como pertencentes à genoespécie *L. interrogans* s.s., e **LC006261** classificada como pertencente à genoespécie *L. borgpetersenii* (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Sumário dos resultados da análise polifásica (fenotípica e genotípica) dos isolados obtidos e respetivo número de acesso no *GenBank*.

Isolados de <i>Leptospira</i> (espécie do roedor)	Testes fenotípicos	Testes serológicos		Testes moleculares	
	Caráter patogénico	Com soros hiperimunes	Com soros monoclonais	iRep – PCR	PCR- gene <i>hap1</i>
		Serogrupos (Títulos recíprocos)	Serovar presuntivo (Títulos)	Serogrupo	Genoespécies (Nº acesso no GenBank)
LDA02 (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sim	Ictero. (1:3200)	Ictero.* (1:10000)	Ictero.	<i>L. interrogans</i> (LC006258)
LDA05 (<i>R. norvegicus</i>)	Sim	Ictero. (1:3200)	Ictero. (1:10000)	Ictero.	<i>L. interrogans</i> (LC006259)
LDA10 (<i>R. norvegicus</i>)	Sim	Ictero. (1:3200)	Ictero. (1:5000)	Ictero.	<i>L. interrogans</i> (LC006260)
HBO34 (<i>Mus musculus</i>)	Sim	Ballum (1:3200)	Arboreae (1:200)	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> (LC006261)

*Ictero. - Icterohaemorrhagiae

3.3.3. Análise dos soros de roedores pela TAM

Foram analisados pela TAM uma amostra constituída por sete (7) soros cujo limiar de positividade foi o título de anticorpos $\geq 1:50$. A reação revelou aglutinação nas amostras LDA04, LDA05 e LDA10 com os seguintes serovares Icterohaemorrhagiae (1: 800); Louisiana (1:400) e Sejroe (1:100), respetivamente.

3.3.4. Amplificação de DNA leptospírico no tecido renal

O DNA de *Leptospira* spp foi amplificado em 21,6% (8⁺/37) das amostras de tecido renal submetidas a ensaios de PCR. O perfil eletroforético obtido, foi comparado com o teste de sensibilidade, representando concentrações de 10³ a 10⁷ leptospiras/ml,

medido por um espectrofotômetro. Os produtos da PCR foram sequenciados e mostraram uma similaridade de 99% com as genoespécies *L. interrogans* s.s. e *L. borgpetersenii*.

3.3.5. Árvore filogenética

A análise filogenética foi realizada com sequências nucleotídicas de DNA dos quatro ‘novos’ isolados (LDA02, LDA5; LDA10 e HBO34), tendo como alvo o gene *hap1* que, após amplificação, produz um amplicão de 262pb.

Foram utilizadas na construção da árvore filogenética, sequências nucleotídicas homólogas (97-100%) e uma sequência correspondendo à genoespécie *L. biflexa*, como *outgroup*, todas depositadas no *GenBank*. As designações assinaladas (com uma marca) correspondem aos ‘novos’ isolados com os seguintes números de acesso no *GenBank*: **LC006258**, **LC006259**, **LC006260** e **LC006261**. Observam-se variações nas sequências de nucleótidos correspondentes aos isolados e emparelhadas com outras genoespécies, as quais formaram dois aglomerados (*Clusters*) distintos, correspondendo às genoespécies *L. interrogans* s.s. e a genoespécie *L. borgpetersenii* (Figura 3.16).

Com a formação destes *clusters*, três genospecies formaram grupos monofiléticos com o grupo *L. interrogans* (*L. noguchi* e *L. kirschneri*) e com o grupo de *L. borgpetersenii* (*L. weilli*), respetivamente. O grupo da genoespécie *L. interrogans* mostra nítida separação do grupo da genoespécie *L. borgpetersenii* e as genoespécies *Leptospira* e *L. biflexa* formam grupos homogêneos entre si e encontram-se separados dos restantes.

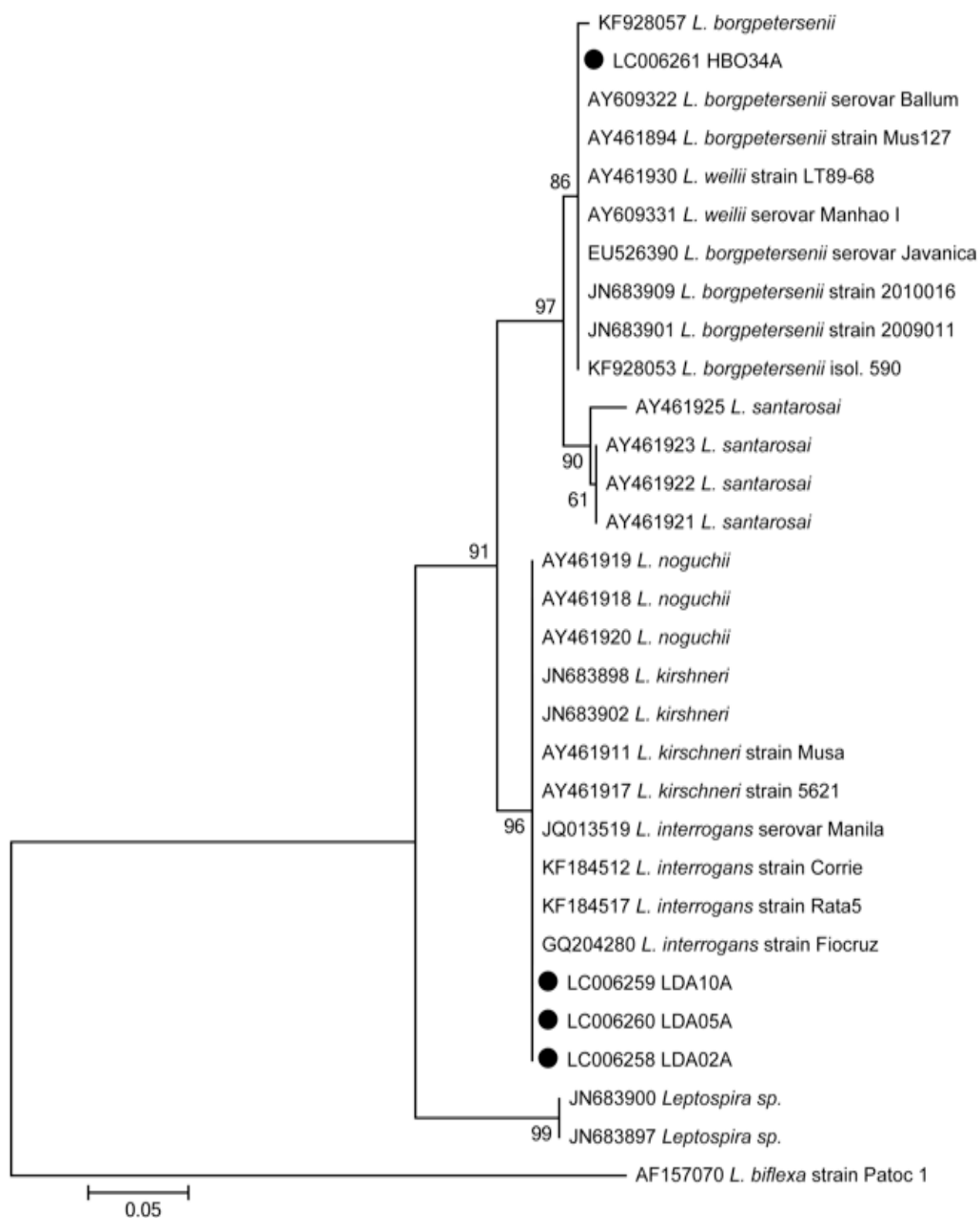


Figura 3.16. Representação gráfica da árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene *hap1* depositadas no *GenBank*. Os pontos (●) assinalam as estirpes isoladas neste estudo.

3.4. DISCUSSÃO

O presente estudo (plasmado no ponto 3 desta tese), identificou os primeiros isolados do género *Leptospira* a partir de ratos capturados em Angola (nas Províncias de Luanda e do Huambo). Os resultados constituem evidência inequívoca da presença de espécies patogénicas do género *Leptospira* circulantes na área do estudo que colonizam roedores de espécies comensais encontrados ao redor de habitações humanas.

Tal como os nossos achados mostraram, a espécie de roedor *R. norvegicus* é conhecida como reservatório de *L. interrogans* sobretudo do serogrupo Icterohaemorrhagiae sendo as espécies *R. rattus* e *Mus musculus* conhecidas como reservatórios de *L. borgpetersenii*, serogrupo Ballum. Esta relação entre as espécies de roedores e os serogrupos de leptospiros, corresponde ao descrito por diversos autores (FAINE *et al.*, 1999, LEVETT, 2001, ADLER AND DE LA PENNA MOCTEZUMA, 2010).

Os ratos da espécie *R. norvegicus* capturados próximo da zona costeira de Luanda, foram os que atingiram maior taxa bacteriológica comparativamente aos demais, corroborando o que está descrito na literatura sobre potenciais disseminadores de leptospiros (FAINE *et al.*, 1999). Resultados igualmente significativos, ligados a esta espécie, foram encontrados por Faria e col., (2008) em roedores capturados numa zona urbana de Salvador-Bahia no Brasil com valores de 80,3% de positividade (=taxa bacteriológica) em culturas (DE FARIA *et al.*, 2008) e mais recentemente pelo trabalho de Cá (2014) com roedores capturados na cidade de Bissau (Guiné-Bissau) e que mostrou positividade em 29% das amostras analisadas pela PCR sendo que 67% pertenciam igualmente à espécie *R. norvegicus* (CÁ, 2014).

Além disso, quando se efetuou a distribuição das espécies pelas localidades onde haviam sido capturadas, foi demonstrado que a espécie *R. norvegicus* habitava as zonas costeiras, as quais constituem o habitat ideal para estes animais proporcionado pelas condições tais como: armazéns de alimentos, e estabelecimentos portuários. Já na zona interior, onde a população foi predominantemente constituída pelas espécies *R. rattus* e

M. musculus, era ocupada por habitações humanas e pequenos empreendimentos agropecuários.

Estudos de diversos autores, enfatizam a importância do isolamento de leptospiras patogénicas em animais ou na população humana assim como a devida caracterização até ao nível de serovar (=taxon base). Esta informação serve para auxiliar na monitorização das fontes de infeção, identificar o perfil epidemiológico e apoiar o direcionamento de medidas de prevenção e de controlo da doença (PEREZ *et al.*, 2011, BALAMURUGAN *et al.*, 2013, BOURHY *et al.*, 2013).

No que respeita às técnicas utilizadas na dissecação do tecido renal com vista a amplificação de DNA leptospírico, estas encontram respaldo na literatura de onde é demonstrado que a maior probabilidade de se encontrar leptospiras é na superfície apical das células epiteliais e no lúmen dos túbulos renais (ROSSETI *et al.*, 2004), orientação que suportou também os nossos procedimentos neste contexto.

Em termos de análise filogenética e, tal como Haake e col., (2004) já haviam demonstrado, os nucleótidos resultantes da amplificação do DNA de leptospiras a partir dos nossos isolados com os *primers* Hap1 também conhecidos como LipL32, mostram-se muito conservados o que dificulta a diferenciação das várias genoéspecie de leptospiras patogénicas em termos de formação de *clusters* homogéneos (HAAKE *et al.*, 2004). Este facto sugere a necessidade de se diversificar os *primers* em futuros ensaios procurando novos alvos moleculares de modo a conseguir-se um maior poder discriminatório entre as referidas genoéspecie.

Quanto à caracterização polifásica (fenotípica e genotípica) dos isolados obtidos usando as diversas abordagens obtiveram-se resultados coerentes. Resultados análogos foram obtidos no estudo realizado por Gonçalves e col. (2010) no mesmo laboratório, utilizando isolados humanos, os quais mostraram igualmente serem consistentes em termos da classificação da espécie e dos serogrupos nomeadamente, *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum* (GONÇALVES, 2009, GONCALVES *et al.*, 2010). Importa ainda referir que os serovares agora identificados (*Icterohaemorrhagiae* e *Ballum*), têm sido ao longo do tempo largamente incriminados como os principais responsáveis pelos quadros de leptospirose grave (LEVETT, 2001, HAAKE AND LEVETT, 2015).

Por outro lado, os quatro isolados obtidos, cerca de 11% da amostra analisada, sugerem uma taxa elevada de sucesso tendo em conta os estudos realizados na África Sub-Sahariana e compilados por De Vries e col. (2014), porém, ainda longe de atingir resultados tão robustos como aqueles realizados nas ilhas dos Açores/ Portugal (COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2000) ou em território indiano (VEDHAGIRI *et al.*, 2010).

Quando comparamos os resultados da serologia em pacientes com síndrome febril residentes nas mesmas zonas onde os roedores foram capturados, conseguiu-se encontrar os mesmos serogrupos tanto na população de roedores como na população humana o que sugere que os ratos sejam, de facto, a principal fonte de infeção nas áreas onde se desenvolveu o estudo. Esta hipótese, encontra fundamento na literatura através de artigos de vários autores que demonstraram a correlação entre a presença de roedores infetados e a ocorrência de casos de leptospirose na população humana, tanto em zonas urbanas como em zonas peri-urbanas e/ou rurais (SCIALFA *et al.*, 2010, FELT *et al.*, 2011, DESVARS *et al.*, 2012, LI S, 2013, JOBBINS *et al.*, 2014).

Assim, de acordo com o conhecimento descrito por diferentes autores entre eles Hartskeerl e col., (2011) e Sarkar e col., (2012) sobre as consequências das mudanças climáticas, o crescimento exponencial da população humana nos grandes centros urbanos, adicionado ao igual crescimento na periferia devido à imigração e à precariedade das condições higiénico-sanitárias levam ao incremento da exposição por parte das populações a fatores de risco decorrentes do contacto com roedores e, por consequência o contacto com as leptospiros (HARTSKEERL *et al.*, 2011, SARKAR *et al.*, 2012). Circunstâncias semelhantes podem assim, ter estado na base da tendência elevada das taxas bacteriológicas encontradas em Luanda comparativamente às do Huambo.

No que respeita a África, os nossos resultados podem contribuir para o conhecimento da distribuição das espécies do género *Leptospira* neste continente, a par das importantes pesquisas que se realizaram na Nigéria (EZEH *et al.*, 1990) no Zimbabwe (FERESU, 1992) e na Tanzânia (MGODE *et al.*, 2006) quer em roedores quer no gado destinado a abate para citar apenas alguns exemplos. Outros trabalhos neste contexto, mas mais recentes, desta vez contribuindo com o conhecimento genético das leptospiros nos respetivos territórios, foram realizados em Madagáscar (RAHELINIRINA

et al., 2010), no Benin (HOUEMENO *et al.*, 2013) e no Egito (SAMIR *et al.*, 2015), cujas conclusões também dão suporte os nossos achados.

Entretanto, os autores Allan e col. (2015) verificaram numa revisão sistemática de vários estudos igualmente realizados no continente Africano, a ausência de trabalhos que associam os dados de infecção em animais e a ocorrência da infecção em humanos. O presente estudo, permitiu por isso, abrir uma perspectiva de investigação relativamente à fonte de infecção por leptospirosas na população humana estudada.

De acordo com Mgode e col. (2015), em África apesar de se assinalarem taxas muito elevadas do agente infeccioso em animais e/ou em humanos, o diagnóstico laboratorial é feito com limitações dada a escassez de isolados locais que permitam aumentar a sensibilidade dos testes serológicos, nomeadamente a TAM. Estes autores, incluíram na bateria de referência, alguns serovares isolados localmente, entre eles o novo serovar Sokoine e obtiveram uma reatividade 10 vezes maior quando analisaram soros da população da mesma área geográfica, o que poderá ser igualmente útil em outros países Africanos (MGODE *et al.*, 2015).

Os isolados identificados no presente estudo, poderão assim, servir a futuros estudos relativos à leptospirose e às leptospirosas em Angola. Para já, esperamos continuar a investigação objetivando o mapeamento das fontes de transmissão de espiroquetas patogénicas do género *Leptospira* com vista a contribuir para o conhecimento epidemiológico da leptospirose no País.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos em ambos os estudos, pensa-se poder apontar as seguintes conclusões:

1. Este foi o primeiro estudo na população humana em Angola visando conhecer a epidemiologia da leptospirose em pacientes com suspeita de malária, estabelecendo a relação com a presença do(s) agente(s) infeccioso(s) em micromamíferos, considerados reservatórios do(s) mesmo(s);
2. O inquérito clínico-epidemiológico permitiu distinguir grupos populacionais de risco à infeção por leptospiras, com destaque para as crianças de 0-9 anos e mulheres. Ficou a percepção de que a atividade ocupacional e o grau de escolaridade variam conforme a Província. A presença de animais junto às habitações e principalmente a de roedores (86%) foi relevante nas respostas afirmativas da população do estudo;
3. Através da utilização da Técnica de Referência para serologia da leptospirose (TAM) constatou-se que existe a probabilidade de 20% de contacto da população do estudo com o agente infeccioso;
4. Quanto à malária, foram confirmados laboratorialmente apenas 13% (86) casos no total de pacientes febris com suspeita clínica da doença
5. Em Luanda obteve-se a maior percentagem de pacientes com anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., cuja distribuição de serogrupos prevalentes, mostrou maior diversidade nas zonas de maior fluxo migratório e de trocas comerciais;
6. Os dados da população com soros reativos ao antigénio (leptospiras), revelaram um perfil epidemiológico distinto, quando comparado com estudos ao nível mundial. As mulheres e as crianças tiveram um valor proporcionalmente maior de infeção, comparadas aos homens. Dados semelhantes foram encontrados no levantamento

feito, através de um outro estudo, no Lubango, porém qualquer destes estudos desenvolvidos em Angola, mostraram tendência contrária quando comparados com os dados ao nível global;

7. Em termos do tipo de ocupação/profissão, a maior proporção de pacientes afetados incidiu no grupo de domésticas, trabalhadores de construção civil e, curiosamente de profissionais de saúde;
8. Os dados dos pacientes residentes na zona peri-urbana cujo tipo de habitação é de alvenaria, sugerem ter havido maior exposição com o(s) agente(s) infeccioso(s), comparativamente aos da zona rural;
9. A captura de roedores, revelou três principais espécies comensais (*R. norvegicus*, *R. rattus* e *M. musculus*) que também são descritos na literatura como potenciais transmissores de leptospirosas patogénicas;
10. A partir dos ratos capturados, foram obtidos, pela primeira vez, em Angola, isolados de *Leptospira* spp, que após caracterização através de técnicas serológicas, fenotípicas e moleculares, se concluiu pertencerem aos serovares Icterohaemorrhagiae e Arborea das espécies, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respetivamente;
11. Os serogrupos identificados nestes roedores, são sobreponíveis aos encontrados nos pacientes estudados, admitindo-se que os ratos possam ter sido a fonte primária de infeção para a população humana nas mesmas áreas;
12. Por último, os resultados do estudo sugerem a necessidade de se estabelecer o diagnóstico laboratorial em Angola, baseado nas técnicas quer serológicas quer moleculares de forma a contribuir para o diagnóstico diferencial de doentes febris com suspeita de malária;

4.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leptospirose tem ganho uma importância cada vez maior em termos de Saúde Pública e Veterinária ou se quisermos no conceito mais atual de “One Health”. Todavia o diagnóstico laboratorial da doença não constitui rotina em muitos países principalmente em África. Até ao momento, tanto o diagnóstico quanto a notificação de casos em Angola, é praticamente inexistente, admitindo-se que os pacientes estejam a ser tratados como casos de malária pela semelhança do seu quadro clínico.

O primeiro estudo cujo objetivo foi a avaliação sero-epidemiológica da leptospirose em pacientes com síndrome febril, foi desenvolvido numa população aleatória de pacientes febris nas duas Províncias, Luanda e Huambo. Através de um inquérito clínico-epidemiológico foram demonstrados distintos perfis demográficos, culturais e sócio-económicos das áreas estudadas, além de fazer um levantamento dos possíveis fatores de exposição ao risco de infeção. Adicionalmente analisaram-se as amostras de sangue destes pacientes tendo-se utilizado a técnica serológica de referência para a leptospirose (TAM).

Pelas condições em que se conduzia o estudo, só foi possível, como já foi anteriormente referido, obter uma amostra de sangue por paciente para a serologia, o que limitou a informação sobre a resposta (completa) do paciente à infeção. Contudo, além dos dados da serologia, obteve-se de cada paciente, a confirmação laboratorial da malária (13,7%) resultado muito aquém do esperado para pacientes com suspeita clínica da doença.

O estudo permitiu-nos também, conhecer no mapa das duas Províncias, a distribuição dos pacientes cujos soros mostraram reatividade específica. Os serogrupos identificados mostram uma distribuição diversificada nas zonas de maior fluxo populacional. Na população de pacientes, foi encontrada associação estatística entre a presença de anticorpos anti-*L. interrogans* s.l., com fatores inesperados como a residência, na Província de Luanda que também inclui a maior percentagem de crianças com serologia positiva. Esta Província apesar de concentrar maior número de habitantes, é mais urbanizada comparativamente ao Huambo e a população dedica-se maioritariamente ao setor terciário.

Os resultados obtidos, mostraram que os reservatórios de leptospiras (ratos e ratazanas) estão presentes em quase todas as casas (86%) ou ao redor delas, segundo afirmação dos próprios pacientes, sendo que no meio rural, estes pequenos mamíferos encontram o seu habitat natural e fontes próprias de alimentação e abrigo, ao contrário da cidade onde as construções em alvernaria e de chão impermeável, podem propiciar o acúmulo da urina dos roedores.

No segundo estudo já com pressupostos sobre o papel dos roedores como fonte da infecção, desenvolveu-se o objetivo principal: saber qual o estado portador de leptospiras nos reservatórios silváticos. Inicialmente o trabalho sofreu limitações logísticas tais como inexistência de armadilhas “tipo gaiola” no mercado local, tendo que se encomendar o seu fabrico artesanal. A outra dificuldade foi encontrada nas comunidades onde a população pouco colaborava e por vezes negava mesmo colaborar, comportamento que de algum modo reflete um misticismo a par de razões culturais muito presentes na população local.

Contudo, apesar do pequeno número de amostras, o estudo permitiu através de uma eficiente coordenação de esforços e com o apoio do pessoal do Laboratório de Referência em Lisboa e dos Laboratórios Regionais de Veterinária (Luanda e Huambo), obter pela primeira vez, quatro isolados de leptospiras patogénicas em ratos capturados em Angola. Este resultado é assim uma evidência irrefutável da circulação destes agentes infecciosos no país. A sua caracterização foi feita conforme a disponibilidade técnica do laboratório, tendo sido possível a identificação do serovar, sendo este o taxon base na classificação taxonômica das leptospiras.

Uma vez comparados os serogrupos infantantes da população humana e da população dos roedores, foi encontrada sobreposição dos serogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum o que sugere que os roedores são a fonte primária de infecção para a população das áreas onde se desenvolveu o estudo.

Constituindo um trabalho pioneiro mas apenas exploratório no que reflete à amostragem da população do estudo, mesmo assim entendemos que ‘abre novas portas’ e sobretudo fundamenta a necessidade de se instalar um laboratório para o diagnóstico da leptospirose no país.

Em termos veterinários, igualmente se abre uma nova perspectiva, pois até ao momento não se atende à leptospirose animal em Angola. Sendo os animais considerados os “sentinelas” de grande parte dos agentes infecciosos, cabe aqui realçar a importância da doença nestas populações quer ao nível da produção pecuária quer dos animais de companhia.

A continuidade deste estudo, terá assim como principal foco a compreensão do padrão epidemiológico da leptospirose no país. Além disso, as futuras abordagens do diagnóstico da doença, podem contar agora com os ‘novos’ isolados locais, constituindo estes uma mais-valia para o estabelecimento do referido diagnóstico laboratorial.

E, como segundo foco, a identificação em outras espécies animais de novas estirpes de leptospiras circulantes, abrangendo as diferentes Províncias do País.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- ABGUEGUEN P, DELBOS V, BLANVILLAIN J, CHENNEBAULT J M, COTTIN J, FANELLO S & PICHARD E, 2008. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J Infect*, 57, 171-8.
- ADLER B, 2015. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: Adler, B (ed.) *Leptospira and Leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol*. 1 ed. Clayton VIC Australia: Springer.
- ADLER B & DE LA PENA MOCTEZUMA A, 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-96.
- ADLER B & FAINE S, 1977. Host Immunological Mechanisms in the Resistance of Mice to Leptospiral Infections. *Infect Immun*, 17, 67-72.
- ALLAN K J, BIGGS H M, HALLIDAY J E, KAZWALA R R, MARO V P, CLEVELAND S & CRUMP J A, 2015. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003899.
- ALSTON J & BROWN H, 1937. The Epidemiology of Weil's Disease. Proceedings of the Royal Society of Medicine 47 741.
- APPELBERG R, 2014. Resposta imunológica inata. in: *Microbiologia Médica, Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. Lousã, Portugal.
- ATALAIA V M, 1966. Breves notas sobre os primeiros casos de Leptospirose animal em Moçambique. *Anais dos Serviços de Veterinária de Moçambique*.
- AURAN N E, JOHNSON R C & RITZI D M, 1972. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. *Infect Immun*, 5, 968-75.
- AZEVEDO J F D & SILVA M M, 1943. Sur l'infection des rats de Lisbonne par le *Leptospira icterohemorrhagiae*. In: IHMT (ed.) *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*. Lisboa: IHMT-UNL.
- BALAMURUGAN V, GANGADHAR N L, MOHANDOSS N, THIRUMALESH S R, DHAR M, SHOME R, KRISHNAMOORTHY P, PRABHUDAS K & RAHMAN H, 2013. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *Springerplus*, 2, 362.

- BAPTISTA F, 1991. *Brucelose e Leptospirose Bovinas nas Explorações Pecuárias Tradicionais e Empresariais da Província da Huila, Angola*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 94 pp
- BELLO S, RODRÍGUEZ M, PAREDES A, MENDIVELSO F, WALTEROS D, RODRÍGUEZ F & REALPE M E, 2012. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. *Biomedica*, 33, 153-60.
- BIGGS H M, BUI D M, GALLOWAY R L, STODDARD R A, SHADOMY S V, MORRISSEY A B, BARTLETT J A, ONYANGO J J, MARO V P, KINABO G D, SAGANDA W & CRUMP J A, 2011. Leptospirosis among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, 85, 275-81.
- BONVICINO C R, OLIVEIRA J A & D'ANDREA P S, 2008. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *In: Centro Panamericano de Febre Aftosa - OPAS/OMS (ed.)*. Rio de Janeiro/ Brasil.
- BOQVIST S, ELIASSON-SELLING L, BERGSTRÖM K & MAGNUSSON U, 2012. The association between rainfall and seropositivity to *Leptospira* in outdoor reared pigs. *The Veterinary Journal*, 193, 135-39.
- BOURHY P, COLLET L, BRISSE S & PICARDEAU M, 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 4061-7.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Bremont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. 7(3): p. e2114.
- BRANGER C, BLANCHARD B, FILLONNEAU C, SUARD I, AVIAT F, CHEVALLIER B & ANDRÉ-FONTAINE G, 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett*, 243, 437-45.
- BRASIL 2002. Manual de Controle de Roedores. *In: Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde-Funasa (ed.)*. Brasília-DF
- BROWN R Z & GORMAN G W 1960. The occurrence of leptospiral infections in feral rodents in southwestern Georgia. *Am J Public Health Nations Health*, 50, 682-8.
- BULACH D M, ZUERNER R L, WILSON P, SEEMANN T, MCGRATH A, CULLEN P A, DAVIS J, JOHNSON M, KUCZEK E, ALT D P, PETERSON-BURCH B, COPPEL R L, ROOD J I, DAVIES J K & ADLER B, 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14560-5.
- CÁ B, 2014. *Importância epidemiológica dos roedores como reservatórios de Leptospira spp. na cidade de Bissau (Guiné-Bissau) e áreas limítrofes.*

- Dissertação de Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 88 pp.
- CALDERON A, RODRIGUEZ V, MATTAR S & ARRIETA G, 2014. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*, 46, 427-32.
- CASTRO R, NÚNCIO S & VIEIRA M L, 2014. *Treponema, Borrelia e Leptospira. in: Microbiologia Médica, Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. 1 ed. Lousã, Portugal.
- CERQUEIRA G M & PICARDEAU M, 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*, 9, 760-8.
- COLLARES-PEREIRA M, KORVER H, TERPSTRA W J, SANTOS-REIS M, RAMALHINHO M G, MATHIAS M L, OOM M M, FONS R, LIBOIS R & PETRUCCI-FONSECA F, 1997. First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *Eur J Epidemiol*, 13, 435-41.
- COLLARES-PEREIRA M, MATHIAS M L, SANTOS-REIS M, RAMALHINHO M G & DUARTE-RODRIGUES P, 2000. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *Eur J Epidemiol*, 16, 1151-7.
- CONSULTORIA DE SERVIÇOS E PESQUISAS-COSEP LDA, CONSULTORIA DE GESTÃO E ADMINISTRAÇÃO EM SAÚDE-CONSAÚDE & MACRO INTERNATIONAL INC, 2011. Inquérito de Indicadores de Malária em Angola 2011. Calverton, Maryland, USA.
- COSSON J F, PICARDEAU M, MIELCAREK M, TATARD C, CHAVAL Y, SUPUTTAMONGKOL Y, BUCHY P, JITTAPALAPONG S, HERBRETEAU V & MORAND S, 2014. Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2902.
- COSTA E, LOPES A A, SACRAMENTO E, COSTA Y A, MATOS E D, LOPES M B & BINA J C 2003. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 4, 141-45.
- COSTA F, HAGAN J E, CALCAGNO J, KANE M, TORGERSON P, MARTINEZ-SILVEIRA M S, STEIN C, ABELA-RIDDER B & KO A I, 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003898.
- DE FARIA M T, CALDERWOOD M S, ATHANAZIO D A, MCBRIDE A J, HARTSKEERL R A, PEREIRA M M, KO A I & REIS M G, 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*, 108, 1-5.
- DE OLIVEIRA T V, MARINHO D P, COSTA NETO C & KLIGERMAN D C, 2012. Climate variables, living conditions and the health of the population: leptospirosis in the city of Rio de Janeiro from 1996 to 2009. *Cien Saude Colet*, 17, 1569-76.

- DE VRIES S G, VISSER B J, NAGEL I M, GORIS M G, HARTSKEERL R A & GROBUSCH M P, 2014. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 28C, 47-64.
- DESVARIS A, NAZE F, VOURC'H G, CARDINALE E, PICARDEAU M, MICHAULT A & BOURHY P, 2012. Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian ocean island of Mayotte. *Am J Trop Med Hyg*, 87, 134-40.
- ELLINGHAUSEN H C JR., 1973. Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospire. *J Med Microbiol*, 6, 487-97.
- ELLIS W A, 2015. Animal Leptospirosis. In: Adler, B (ed.) *Leptospira and Leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol*. 1 ed. Clayton VIC Australia: Springer.
- EVANGELISTA K V & COBURN J, 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*, 5, 1413-25.
- EZEH A O, KMETY E, ELLIS W A, ADDO P B & ADESIYUN A A, 1990. A new leptospiral serovar in the Pyrogenes serogroup isolated in Nigeria. *Rev Sci Tech*, 9, 1195-6.
- FAINE S, ADLER, B BOLIN C & PEROLAT P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*, Melbourne, Vic. Australia, MediSci.
- FELT S A, WASFY M O, EL-TRAS W F, SAMIR A, RAHAMAN B A, BOSHRA M, PARKER T M, HATEM M E, EL-BASSIOUNY A A, MURRAY C K & PIMENTEL G, 2011. Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am J Trop Med Hyg*, 84, 420-25.
- FERESU, S B 1992. Isolation of *Leptospira interrogans* from kidneys of Zimbabwe beef cattle. *Vet Rec*, 130, 446-8.
- FERESU S B, ANN BOLIN C, VAN DE KEMP H & KORVER H, 1999. Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. *Zentralbl Bakteriologie*, 289, 19-29.
- FERESU S B, BOLIN C A & KORVER H, 1993. A new leptospiral serovar in the Icterohaemorrhagiae serogroup isolated from an ox in Zimbabwe. *Int J Syst Bacteriol*, 43, 179-82.
- FERESU S B, BOLIN C A & KORVER H, 1998. A new leptospiral serovar, Ngavi, in the Tarassovi serogroup isolated from Zimbabwe oxen. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 1, 207-13.
- FERESU S B, BOLIN C A, KORVER H & TERPSTRA W J, 1994. Classification of leptospire of the pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Syst Bacteriol*, 44, 541-46.

- FORTES-GABRIEL E, CARREIRA T & VIEIRA M L, 2013. First isolates of *Leptospira interrogans* from rodents and leptospirosis seroprevalence of human patients with malaria symptoms in Luanda and Huambo provinces (Angola). *Tropical Medicine & International Health*, Vol. 18, 52-107.
- GARCIA J V S, 2011. *Contribuição para o conhecimento da Leptospirose humana na região do Lobito (Angola): aplicação de métodos de diagnóstico serológico e molecular*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 58 pp.
- GOARANT C, BOURHY P, D'ORTENZIO E, DARTEVELLE S, MAURON C, SOUPE-GILBERT M E, BRUYERE-OSTELLS L, GOURINAT A C, PICARDEAU M, NATO F & CHANTEAU S, 2013. Sensitivity and Specificity of a New Vertical Flow Rapid Diagnostic Test for the Serodiagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2289.
- GONÇALVES A T, PAIVA C, MELO-MOTA F, VIEIRA M L, CARREIRA T, NUNES M S, MOTA-VIEIRA L, AHMED A, HARSTKEERL R A, HYDE K & COLLARES-PEREIRA, M 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *Int J Infect Dis*, 14 Suppl 3, e148-53.
- GONÇALVES A T S, 2009. *Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de Leptospira sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 117 pp.
- GOOGLE, E. 2012. *Navigating in Google Earth* [Online]. Google. Available: <http://earth.google.com> [Accessed Jun 2013].
- GUIDUGLI F, CASTRO A, ATALLAH A & ARAÚJO M, 2010. Antibiotics for treating leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 20 (1).
- HAAKE D A & LEVETT P N, 2015. Leptospirosis in Humans. In: Adler, B (ed.) *Leptospira and Leptospirosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1 ed. Clayton VIC Australia: Springer.
- HAAKE D A, SUCHARD M A, KELLEY M M, DUNDOO M, ALT D P & ZUERNER R L, 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol*, 186, 2818-28.
- HARTSKEERL P A & TERPSTRA W J, 1996. Leptospirosis in wild animals. *Vet Q*, 18, 149-50.
- HARTSKEERL R A, COLLARES-PEREIRA M & ELLIS W A, 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, 17, 494-501.
- HERBRETEAU V, JITTAPALAPONG S, RERKAMNUAYCHOKE W, CHAVAL Y, COSSON J-F & MORAND S, (eds.) 2011. *Protocols for field and laboratory rodent studies*, Bangkok: Kasetsart University Press.

- HOLT J, DAVIS S & LEIRS H, 2006. A model of Leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop*, 99, 218-25.
- HOUEMENOU G, AHMED A, LIBOIS, R & HARTSKEERL R A, 2013. *Leptospira* spp. Prevalence in Small Mammal Populations in Cotonou, Benin. *ISRN Epidemiology*, 2013, 1-8.
- ILS. 2013. 8th Scientific Meeting of Leptospirosis. In: ILS, ed. 8th Scientific Meeting of Leptospirosis, 2013 Fukuoka, Japan. 76.
- INADA R, IDO Y, HOKI R, ITO H & WANI H, 1918. Intravenous Serotherapy of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). *J Exp Med*, 27, 283-303.
- INADA R, IDO Y, HOKI R, KANEKO R & ITO H, 1916. The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). *J Exp Med*, 23, 377-402.
- INE 2011. Inquérido de Indicadores Básicos de Bem Estar. Instituto Nacional de Estatística de Angola. Luanda, Angola: Instituto Nacional de Estatística.
- JOBINS S E, SANDERSON C E & ALEXANDER K A, 2014. *Leptospira interrogans* at the human-wildlife interface in northern Botswana: a newly identified public health threat. *Zoonoses Public Health*, 61, 113-23.
- JOHNSON R C & HARRIS V G, 1967. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire . I. Growth at Low Temperatures. *J Bacteriol*, 94, 27-8.
- JOHNSON R C & ROGERS P, 1964. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire with 8-Azaguanine. *J Bacteriol*, 88, 1618-23.
- KMETY E & DIKKEN H, 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groning: University Press.
- KO A I, GOARANT C & PICARDEAU M, 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 736-47.
- LAU C, SMYTHE L & WEINSTEIN P, 2010. Leptospirosis: An emerging disease in travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 33-39.
- LEE S H, KIM K A, PARK Y K, SEONG I W, KIM M J & LEE Y J, 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene*, 254, 19-28.
- LEVETT P N, 2001. *Leptospira* and Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14, 296–326.
- LEVETT P N, 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae: Minutes of the closed meeting, 12 and 13 November 2005, Chiang Mai, Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 2019-20.

- LEVETT P N, 2015. Systematics of Leptospiraceae. In: Adler, B (ed.) *Leptospira and Leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol*. Clayton, VIC Australia: Springer.
- LI S W D, ZHANG C, WEI X, TIAN K, LI X, NIE Y, LIU Y, YAO G, ZHOU J, TANG G, JIANG X, YAN J, 2013. Source tracking of human leptospirosis: serotyping and genotyping of *Leptospira* isolated from rodents in the epidemic area of Guizhou province, China. *BMC Microbiol*, 13, 2180.
- LI S J, WANG D M, ZHANG C C, LI X W, YANG H M, TIAN K C, WEI X Y, LIU Y, TANG, G P, JIANG X G & YAN J, 2013. Molecular typing of *Leptospira* spp. strains isolated from field mice confirms a link to human leptospirosis. *Epidemiol Infect*, 141, 2278-85.
- MARÔCO, J 2014. Variáveis, População e Amostras. *Análise Estatística com o SPSS Statistics*. 6 ed. Pêro Pinheiro: Report Number.
- MARTINHO A & TAVEIRA, N 2014. Princípios Gerais da Bacteriologia. In: *Microbiologia Médica, Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. 1 ed. Lousã, Portugal: Lidel, Edições Técnicas, Lda.
- MARTINS M, CASTRO R & VIEIRA M L, 2014. Métodos de Diagnóstico Serológico. In: Lidel (ed.) *Microbiologia Médica: Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. Lousã-Portugal: Lidel.
- MAT. 2013. *Distribuição geográfica de Luanda. Ministério da Administração do Território de Angola* [Online]. Angola. Available: <http://www.mat.gov.ao> [Accessed 10 July 2013].
- MAT. 2013. *Província do Huambo. Ministério da Administração do Território de Angola* [Online]. Luanda, Angola: Ministério da Administração do Território. Available: <http://www.mat.gov.ao> [Accessed 12 July 2013].
- MCCLAIN J & BRUCE L, 1984. Doxycycline Therapy for Leptospirosis. *Ann Intern Med*, 100, 696.
- MERIEN F, AMOURIAUX P, PEROLAT P, BARANTON G & SAINT GIRONS I, 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 30, 2219-24.
- MGODE G F, MACHANG'U R S, GORIS M G, ENGELBERT M, SONDIJ S & HARTSKEERL R A, 2006. New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 593-7.
- MGODE G F, MACHANG'U R S, MHAMPHI G G, KATAKWEBWA A, MULUNGU L S, DURNEZ L, LEIRS H, HARTSKEERL R A & BELMAIN S R, 2015. *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates and Reservoir Hosts. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0004251.

- MINSA 2014. Relatório Anual das Actividades Desenvolvidas. Ministério da Saúde de Angola. Angola.
- MINUA 2006. Relatório do Estado Geral do Ambiente em Angola. Luanda - Angola.
- MURPHY K, 2012. The Humoral Immune Response. *In: Science, G (ed.) Janeway's Immunology*. 8th ed. New York, USA: Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
- MURRAY G, 2015. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. *In: Adler, B (ed.) Leptospira and Leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol*. Melbourne, Vic Australia: Springer.
- NASCIMENTO A L T O, KO A I, MARTINS E A L, MONTEIRO-VITORELLO C B, HO P L, HAAKE D A, VERJOVSKI-ALMEIDA S, HARTSKEERL R A, MARQUES M V, OLIVEIRA, M C, MENCK, C F M, LEITE, L C C, CARRER, H, COUTINHO, L L, DEGRAVE W M, DELLAGOSTIN O A, EL-DORRY H, FERRO E S, FERRO M I T, FURLAN L R, GAMBERINI M, GIGLIOTI E A, GOES-NETO A, GOLDMAN G H, GOLDMAN M H S, HARAKAVA R, JERONIMO S M B, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I L M, KIMURA E T, KURAMAE E E, LEMOS E G M, LEMOS M V F, MARINO C L, NUNES L R, DE OLIVEIRA R C, PEREIRA G G, REIS M S, SCHRIEFER A, SIQUEIRA W J, SOMMER, P, TSAI, S M, SIMPSON, A J G, FERRO, J A, CAMARGO, L E A, KITAJIMA J P, SETUBAL J C & VAN SLUYS M A, 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*, 186, 2164-72.
- NASCIMENTO A L T O, VERJOVSKI-ALMEIDA S, VAN SLUYS M A, MONTEIRO-VITORELLO C B, CAMARGO L E, DIGIAMPIETRI L A, HARSTKEERL R A, HO P L, MARQUES M V, OLIVEIRA M C, SETUBAL J C, HAAKE D A & MARTINS E A, 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res*, 37, 459-77.
- NCBI, 2013. *Nucleotide database: Basic Local Alignment Search Tool* [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- NDEYANELAO E G E. 2014. *Leptospirose humana na Província da Huíla: rastreio serológico e molecular de doentes assistidos no Hospital Central Dr. Agostinho Neto*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 129 pp.
- NOGUCHI H, 1917. Spirochaeta Icterohaemorrhagiae in American Wild Rats and Its Relation to the Japanese and European Strains : First Paper. *J Exp Med*, 25, 755-63.
- NOGUCHI H, 1918. The Survival of *Leptospira* (Spirochaeta) Icterohaemorrhagiae in Nature; Observations Concerning Microchemical Reactions and Intermediary Hosts. *J Exp Med*, 27, 609-25.

- OBAL G, PLANKA R & DEANC D, 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*, 1265-76.
- OLIVEIRA M S, 2009. Regionalização dos serviços de saúde: desafios para o caso de Angola. *Cad Saúde Pública*, 25, 751-60.
- PAIVA-CARDOSO M N, ARENT Z, GILMORE C, HARTSKEERL R & ELLIS W A, 2013. Altodouro, a new *Leptospira* serovar of the Pomona serogroup isolated from rodents in northern Portugal. *Infect Genet Evol*, 13, 211-7.
- PEREZ J, BRESCIA F, BECAM J, MAURON C & GOARANT C, 2011. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1361.
- PESTANA M H & GAGEIRO J N, 2008. Análise Univariada. *Análise de Dados para Ciências Sociais, a complementariedade do SPSS*. 5ª ed. Lisboa, Portugal: Edições Sílabo.
- PICARDEAU M, 2015. Genomics, proteomics, and genetics of *Leptospira*. In: Adler, B (ed.) *Leptospira and leptospirosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. Melbourne, Vic Australia: Springer.
- PICARDEAU M, BULACH D M, BOUCHIER C, ZUERNER R L, ZIDANE N, WILSON P J, CRENO S, KUCZEK E S, BOMMEZZADRI S, DAVIS J C, MCGRATH A, JOHNSON M, BOURSAUX-EUDE C, SEEMANN T, ROUY Z, COPPEL L R, ROOD J I, LAJUS A L, DAVIES J K, ME'DIGUE C & ADLER B, 2008. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS One*, 3, e1607.
- PORTUGAL 2012. *Manual de Boas Práticas de Controlo de Roedores para a Região Autónoma dos Açores*, Região Autónoma dos Açores.
- POSTIC D, MÉRIEN F, PEROLAT P & BARANTON G, 2000. Diagnostic Biologique Leptospirose-Borreliose de Lyme. *Méthodes Biologique de la Leptospirose*. 2nd ed.
- RAHELINIRINA S, LEON A, HARSTSKEERL R A, SERTOUR N, AHMED A, RAHARIMANANA C, FERQUEL E, GARNIER M, CHARTIER L, DUPLANTIER J M, RAHALISON L & CORNET M, 2010. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS One*, 5, e14111.
- REN S-X, FU G, JIANG X-G, RONG ZENG Y-G M, XU H, ZHANG Y-X, XIONG H, LU G, LU L-F, JIANG H-Q, JIA J, TU Y-F, JIANG J-X, GU W-Y, ZHANG Y-Q, CAI Z, SHENG H-H, IN H-F, ZHANG Y, ZHU G-F, WANK M, HUANGK H-L, QIAN Z, WANG S-Y, MA W, YAO Z-J, SHEN Y, QIANG B-Q, XIA Q-C, GUO X-K, DANCHINQ A, GIRONS I S, SOMERVILLE R L, WEN Y-M, SHIK M-H, CHEN Z, XUK J-G & ZHAO G-P 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira*

- interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 10.1038/nature01542.
- RICALDI J N, FOUTS D E, SELENGUT J D, HARKINS D M, PATRA K P, MORENO A, LEHMANN J S, PURUSHE J, SANKA R, TORRES M, WEBSTER N J, VINETZ J M & MATTHIAS M A, 2012. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, 1-16.
- RITCHIE A E & ELLINGHAUSEN H C, 1965. Electron Microscopy of Leptospires. I. Anatomical Features of *Leptospira Pomona*. *J Bacteriol*, 89, 223-33.
- ROMERO-VIVAS C M, CUELLO-PEREZ M, AGUDELO-FLOREZ P, THIRY D, LEVETT P N & FALCONAR A K, 2013. Cross-sectional study of *Leptospira* seroprevalence in humans, rats, mice, and dogs in a main tropical sea-port city. *Am J Trop Med Hyg*, 88, 178-83.
- ROSSETI C A, VANASCO B N, PINI N & CARFAGNINI J E, 2004. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire. *Pesq Vet Bras*, 24, 6-10.
- SAMIR A, SOLIMAN R, EL-HARIRI M, ABDEL-MOEIN K & HATEM M E, 2015. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*, 48, 272-7.
- SCIALFA E, BOLPE J, BARDON J C, RIDAO, G, GENTILE, J & GALLICCHIO, O 2010. Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 42, 126-8.
- SEBEK Z, MIORINI I, BROSCHE R, BUCHRIESER C, BUCHRIESER V, SIXL W & VALOVA M 1989. A survey of leptospirological studies carried out on the Cape Verde Islands. *Geogr Med Suppl*, 5, 153-60.
- SKERMAN V B D, MCGOWAN V & SNEATH P H A, 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 225-420.
- SMYTHE L D, ADLER B, HARTSKEERL R A, GALLOWAY R L, TURENNE C Y & LEVETT P N, 2013. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A & KUMAR S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-9.
- TERPSTRA W J, 1992. Leptospirosis in Africa. In: Kit-Amsterdam, ed. Leptospirosis on the african continent, University of Zimbabwe. 54-68.
- TORGERSON P R, HAGAN J E, COSTA F, CALCAGNO J, KANE M, MARTINEZ-SILVEIRA M S, GORIS M G, STEIN C, KO A I & ABELA-RIDDER B, 2015. Global Burden of

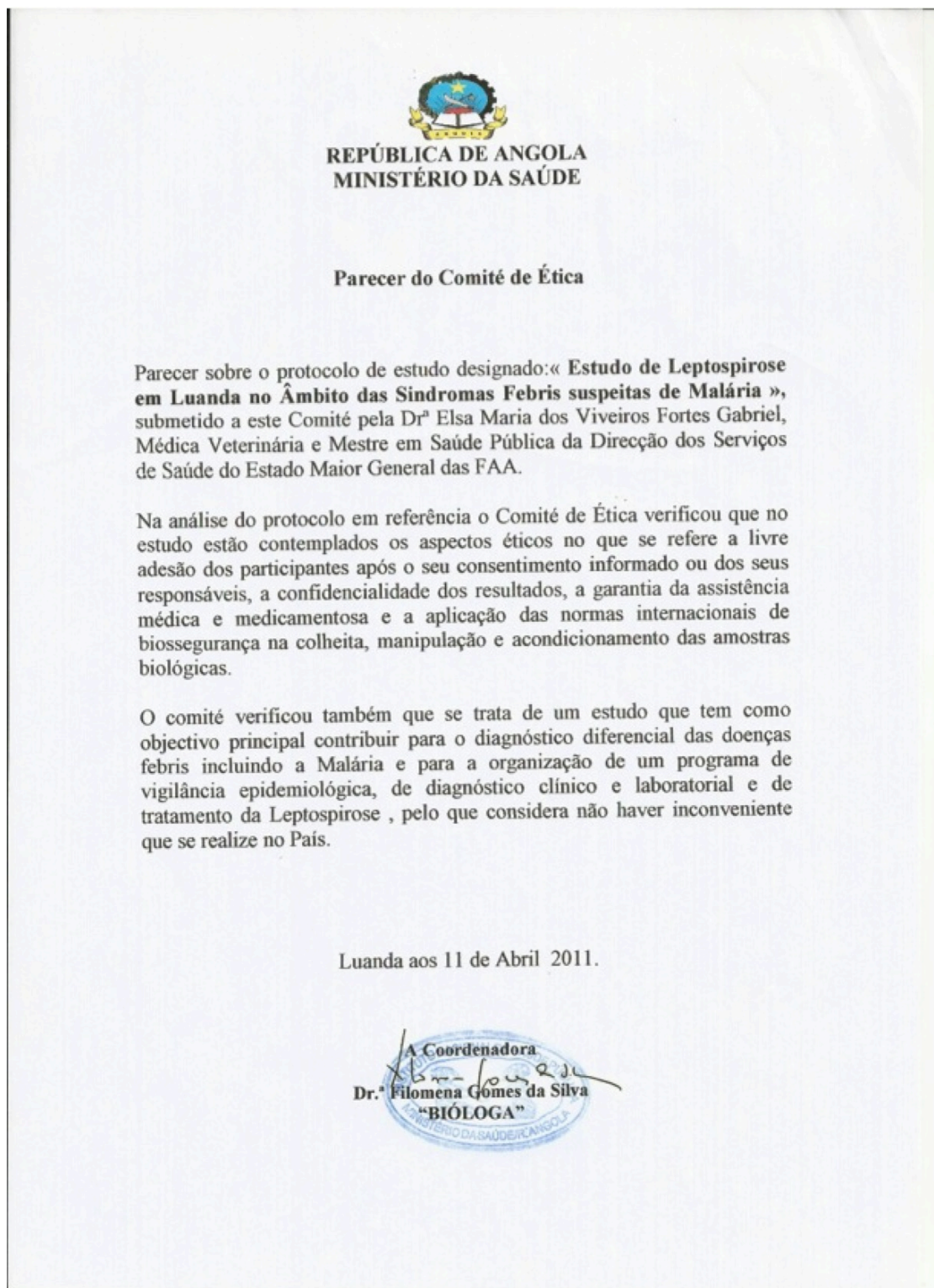
- Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0004122.
- TRUONG K N & COBURN J, 2011. The emergence of severe pulmonary hemorrhagic leptospirosis: questions to consider. *Front Cell Infect Microbiol*, 1, 24.
- VANASCO N B, SCHMELING M F, LOTTERSBERGER J, COSTA F, KO A I & TARABLA H D, 2008. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop*, 107, 255-8.
- VEDHAGIRI K, NATARAJASEENIVASAN K, PRABHAKARAN S G, SELVIN J, NARAYANAN R, SHOUCHE Y S, VIJAYACHARI P & RATNAM S, 2010. Characterization of *Leptospira borgpetersenii* isolates from field rats (*Rattus norvegicus*) by 16s rRNA and lipL32 gene sequencing. *Braz J Microbiol*, 41, 150-7.
- VIEIRA M L, 2006. *Aspectos da Caracterização Antigénica e Molecular da Leptospirose em Áreas Endémicas*. PhD Thesis, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 300 pp.
- VILANOVA M, 2014. Resposta imunológica humoral. In: Lidel (ed.) *Microbiologia Médica: Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. Lousã, Portugal.
- VIVEIROS M, COUTO I & INÁCIO J, 2014. Diagnóstico Molecular. In: Lidel (ed.) *Microbiologia Médica: Fundamentos de Microbiologia, Conceitos Básicos da Resposta Imunológica, Princípios do diagnóstico Microbiológico Médico, Bacteriologia*. Lousã, Portugal.
- WANG C & HE H, 2013. *Leptospira* spp. in commensal rodents, Beijing, China. *J Wildl Dis*, 49, 461-3.
- WHO 1952. Advances in the control of zoonosis. *World Health Organization*.
- WHO 1999. Leptospirosis Worldwide, 1999. *Weekly Epidemiological Record releve Epidemiologique Hebdomadaire*. Geneve, Switzerland.
- WHO 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. In: World Health Organization, G O (ed.) *World Health Organization*. Geneva, Switzerland: ILS - International Society of Leptospirosis.
- WHO 2007. Leptospirosis: Laboratory Manual. World Health Organization: Country Office for Índia.
- WHO 2010. Report of the first Meeting of Leptospirosis Burden the Epidemiology Reference Group. Geneve, Switzerland.
- WHO 2011. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Geneva, Switzerland.

- WHO 2013. Country Cooperation Strategy. *At a Glance*.
- WHO 2013. World Health Organization. Data. Geneva, Switzerland.
- WHO 2013. World Malaria Report 2013. Geneva, Switzerland: WHO Press, World Health Organization.
- WITMER G W, MARTINS H & FLOR L, 2004. Leptospirosis in the Azores: the Rodent Connection. *In: Gorenzel, R M T a W P*, ed. 21st Vertebrate Pest Conference, California, USA. University of California, 217-20.
- XUE F, YAN J & PICARDEAU M, 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect*, 11, 328-33.
- ZUERNER R L, 2015. Host response to *Leptospira* infection. *In: Adler, B* (ed.) *Leptospira and Leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol*. Clayton, VIC Australia: Springer.

6. ANEXOS

6.1. DOCUMENTAÇÃO

6.1.1. Parecer do Comité Nacional de Ética (Angola)



6.1.2. Modelo do Termo de Consentimento Informado

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DAS SÍNDROMES FEBRIS SUSPEITAS DE MALÁRIA NO HUAMBO

Investigadores: Dra Elsa M^a dos V. Fortes Gabriel

Dr. Nuno Miguel Marques

Eu ou responsável legal de _____ de _____ anos de idade, sexo _____, fui esclarecido de que o objectivo deste estudo é conhecer a existência de Leptospirose na população de Luanda e para o qual é necessário analisar uma amostra de 2ml de sangue e responder a um questionário. ESTOU CIENTE QUE O MEU ENCARREGANDO PODERÁ TER um desconforto com a picada da agulha no dedo e no braço para retirar o sangue da veia SEM OUTROS TRANSTORNOS ADICIONAIS e isso não causará nenhum outro problema.

Manifesto o meu *livre consentimento* em PERMITIR A PARTICIPAÇÃO DO MEU ENCARREGANDO participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor económico, a receber ou a pagar, sendo este estudo importante para mim e para a população.

Estou seguro de que o resultado do exame bem como outras informações a meu respeito ou do meu encarregando serão mantidos em sigilo.

Poderei ser contactado a qualquer momento enquanto decorrer este estudo e conto com a assistência desta Unidade Hospitalar, caso se confirme estar doente de Leptospirose, Dengue ou Chicungunya.

Sendo voluntário, poderei recusar ou retirar este consentimento, sem prejuízo do projecto de estudo, nem QUALIDADE E DISPONIBILIDADE DE ATENDIMENTO NESTA E/OU QUALQUER OUTRA UNIDADE HOSPITALAR PÚBLICA EM ANGOLA.

Data ____/____/____

Data ____/____/____

Nome e assinatura ou impressão digital
do paciente ou seu responsável legal

Nome e assinatura do responsável por obter a
assinatura

Obs. Ter à mão uma almofada com tinta para os responsáveis que não sabem escrever

6.1.3. Formulário do Inquérito Clínico-Epidemiológico (Parte I)

AVALIAÇÃO DA SÍNDROMA FEBRIL SUSPEITA DE MALÁRIA			
Unidade Sanitária	Identificação do Paciente	Data	Contactos
	Nome: Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> (Grávida? Sim <input type="checkbox"/> Trimestre ____º; Não <input type="checkbox"/> Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Escolaridade: Analfabeto <input type="checkbox"/> Primário <input type="checkbox"/> Secundário <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/> Profissão: _____		Telefone: Bairro: Município:
Início da febre: ____ dias Temperatura: ____ °C ; TA: ____/____ mmHg			
Viagens nas últimas 3 semanas: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> [Cidade: _____; Província: _____; País: _____; 1-3x <input type="checkbox"/> >3x <input type="checkbox"/> Última estadia: ____/____/____]			
Vacinação para Febre Amarela: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> (Último reforço: ____/____/____)			
Sinais e sintomas relevantes			
Pulso: Filiforme <input type="checkbox"/> Cheio <input type="checkbox"/> Rítmico <input type="checkbox"/> Arritmico <input type="checkbox"/> Freq: _____ ppm Mucosas pálidas: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Icterícia: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sufusão conjuntival <input type="checkbox"/> Mialgias <input type="checkbox"/> Artralgias <input type="checkbox"/> Cefaleias <input type="checkbox"/> Dores retro-oculares <input type="checkbox"/> Dores abdominais <input type="checkbox"/> Astenia <input type="checkbox"/> Anorexia <input type="checkbox"/> Alteração do gosto <input type="checkbox"/> Náuseas <input type="checkbox"/> Vômitos <input type="checkbox"/> Diarreia <input type="checkbox"/> (sangue <input type="checkbox"/> muco <input type="checkbox"/> Corrimento nasal <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Alterações da visão: Sim <input type="checkbox"/> (Quais?: _____) Não <input type="checkbox"/> Exantema (rash): Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Onde?: _____) Prurido: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Alteração do estado de consciência: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sinais meníngeos: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Convulsões: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sinais neurológicos focais: Sim <input type="checkbox"/> (Quais? _____) Não <input type="checkbox"/> Sangramentos: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Epistáxis <input type="checkbox"/> Gengivorragias <input type="checkbox"/> Hemoptises <input type="checkbox"/> Hematemeses <input type="checkbox"/> Melenas <input type="checkbox"/> Rectorragias <input type="checkbox"/> Metrorragias <input type="checkbox"/> (Data última menstruação: ____/____) Equimoses <input type="checkbox"/> Diátese hemorrágica <input type="checkbox"/> Hepatomegália <input type="checkbox"/> Esplenomegália <input type="checkbox"/> Adenomegalias: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Onde?: _____) Edemas: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Ascite <input type="checkbox"/> MIs <input type="checkbox"/> Anasarca <input type="checkbox"/> Choque: Sim <input type="checkbox"/> (Dia# _____) Não <input type="checkbox"/> Tomou antibióticos / antimaláricos? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Quais? _____ Há quantos dias? ____ TIP: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Teve malária nos últimos 3 meses? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Teve febre nos últimos 3 meses? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>			

6.1.4. Formulário do Inquérito Clínico-Epidemiológico (Parte II)⁵

Condições habitacionais
Uso de mosquiteiro na última noite: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> N° de mosquiteiros casa: _____
Uso de repelentes: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Pessoais <input type="checkbox"/> Domicílio <input type="checkbox"/> Nome: _____)
Pulverização domiciliar: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Última: __/__/__)
Transusão de sangue (últimos 90 dias): Sim <input type="checkbox"/> (Local: _____) Não <input type="checkbox"/>
Residência fixa: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Moradia: Alvenaria <input type="checkbox"/> Casa capim <input type="checkbox"/> Alumínio <input type="checkbox"/> Outra: _____
N° de divisões: _____; N° de pessoas que moram na casa: _____
Casa de banho/latrina: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Guarda água em casa?: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Água canalizada: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Tratamento de água e esgoto: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Origem da água: rede pública <input type="checkbox"/> chafariz <input type="checkbox"/> rio <input type="checkbox"/> cacimba <input type="checkbox"/> tanque de água <input type="checkbox"/> chuva <input type="checkbox"/>
Energia eléctrica: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ar condicionado: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Lixo à volta da casa: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ratos em casa: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Animais domésticos: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Cães/gatos <input type="checkbox"/> galinhas <input type="checkbox"/> suínos <input type="checkbox"/> caprinos/ovinos <input type="checkbox"/> bovinos <input type="checkbox"/>)
Anda descalço na chuva: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Toma banho no rio: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Pesca em rios?: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Cultiva?: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Faz criação de animais?: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Quais? _____)
Resultado das análises
Teste rápido malária: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Gota espessa: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Não efetuada <input type="checkbox"/>
Teste rápido dengue: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Torniquete: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Teste rápido chikungunya: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Teste rápido leptospirose: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
Anemia: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> (mín. Hg : _____ mg/dl; Dia# _____); Hematócrito (Máx: _____%; Dia# _____)
Leucopenia: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> (mín.: _____ x10 ³ ; Dia# _____); Trombocitopenia: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> (mín. plaquetas _____ x10 ³ ; Dia# _____); Insuficiência renal: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> (Máx. creatinina: _____ mg/dl; Dia# _____)
Alteração da função hepática: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> [Máx.: TGP: _____ U/L (Dia # _____); TGO: _____ U/L (Dia # _____); BT: _____ U/L (Dia # _____); LDH: _____ U/L (Dia # _____)]; Tempo de coagulação: _____ (s)
Rx tórax: Normal <input type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> (_____); Ecografia abdominal: Normal <input type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/> (_____)
Evolução clínica
Melhoria clínica com alta para domicílio <input type="checkbox"/> Morte <input type="checkbox"/> Complicações: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> (Hepatite <input type="checkbox"/>
Encefalite/Meningite <input type="checkbox"/> Insuficiência renal <input type="checkbox"/> Miocardite <input type="checkbox"/> Pneumonia <input type="checkbox"/> Choque hemorrágico <input type="checkbox"/>
Outra: _____)
Nome do Inquiridor: _____

⁵ Este formulário (Parte I e Parte II) contém uma componente clínica a qual foi utilizada pelos médicos envolvidos no estudo.

6.2. PROTOCOLOS⁶

6.2.1. Técnica de Aglutinação Macroscópica (em lâmina)

Este método baseia-se na observação de uma reação antigénio-anticorpo sobre lâmina, após mistura do soro problema com um antigénio “inativado”, muito estável e hiper-reactivo, visto ser constituído por uma ou mais estirpes isoladas localmente em termos da população alvo.

Funciona como um teste de rastreio dos soros duvidosos e positivos, os quais deverão ser posteriormente analisados pela técnica de referência para confirmação da reatividade, face à eventual ocorrência de falsos positivos (reatividade cruzada). O interesse da sua aplicação reside no facto de ser um teste rápido e muito simples, para se utilizar em áreas onde não exista o apoio de um laboratório especializado, uma vez garantida a qualidade do antigénio a usar.

Reagentes e material:

- Solução contendo antigénio de *L. interrogans* s.l., inativado produzido no laboratório
- Micropipetas de 5 a 50µl e 200 a 1000µl + pontas
- Controlos positivo e negativo
- Placas de vidro (10cm x 5cm)
- Palitos de plástico ou de madeira

Procedimento:

- 1 Agitar a solução antigénica diluída a 1:10 em tampão (PBS), bem como o respetivo soro problema (usar uma ponta nova sempre que se troca de amostra).
- 2 Colocar 15µl de cada suspensão controlo, positivo e negativo, dos soros a analisar e respetivas diluições, na placa de aglutinação microscópica (procedimento facultativo).

⁶ Extraídos e adaptados do ficheiro de Protocolos em uso no laboratório e dos trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme. Unidade de Microbiologia Médica- IHMT-UNL.

- 3 Colocar 15µl de suspensão antigénica homogeneizada sobre cada amostra a testar e referidos controlos.
- 4 Agitar com a ponta, espalhando em círculos com de ≈15mm de diâmetro.
- 5 Agitar até 4 min, a 25 RPM, ou manualmente.
- 6 Após agitação ler imediatamente contra um fundo escuro, usando uma fonte de luz oblíqua.

Classificar e registar a aglutinação como se segue:

- Sem aglutinação ⇒ Negativo
- Leve turbidiscência ⇒ Traço
- Aglutinação fina muito fraca ⇒ +
- Pequenos agregados e turbidiscência ⇒ ++
- Grandes agregados e leve turbidiscência ⇒ +++
- Grandes agregados e não turbidiscência ⇒ ++++

5. Descartar as placas usadas para uma solução desinfetante.
6. Interpretação dos resultados (Quadro 6.1):

Quadro 6.1. Interpretação dos resultados do teste de aglutinação macroscópica em lâmina

RESULTADOS	CARACTERÍSTICAS	CLASSIFICAÇÃO
Positivo	Grandes agregados (aglutinação) e não turbidiscência	> ++
Não Conclusivo (NC)	Pequenos agregados e turbidiscência	++
Negativo	Sem aglutinação	< ++

6.2.2. Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM)

(Adaptado de Vieira, 2006)

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

A técnica é efectuada em microplacas de fundo plano e baseia-se na reação dos soros previamente diluídos numa ou duas diluições, na fase de rastreio e, posteriormente, em diluições ao dobro, face aos antígenos (vivos) de referência reativos. Em regra, sugere-se a utilização das estirpes isoladas localmente para além dos antígenos representativos dos serogrupos patogénicos existentes (Tabela 6.1), de forma a aumentar a sensibilidade do teste.

Apesar de ser considerada a *técnica de referência*, não deixa de ter as seguintes limitações:

1º Obriga a intervenção de pessoal especializado para diminuir o erro inerente à subjetividade da leitura do título terminal.

2º Obriga a manutenção de um elevado número de estirpes em cultura com os consequentes custos em recursos humanos e materiais.

NOTA: A técnica de aglutinação microscópica apenas permite o diagnóstico **presuntivo** do serogrupo da estirpe infectante de *Leptospira interrogans* sensu lato. A confirmação do serovar obriga ao isolamento da estirpe patogénica.

Reagentes e equipamento:

- ✓ Antígenos vivos da bateria de serovares de referência (Tabela 6.1) – culturas de 4 a 13 dias em meio líquido EMJH com uma densidade aproximada de 2×10^8 células/ml, previamente examinadas em microscópio de fundo escuro
- ✓ 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 objetiva de longa distância focal (x20) para leitura direta das microplacas
- ✓ Estufa de incubação a 37° C

Tabela 6.1. Composição da bateria de serovares de referência utilizada no estudo

Serogrupo	Serovar	Estirpe
Australis	Australis	Ballico
Autunalis	Autunalis	Akiamy
Ballum	Ballum	Mus 127
Ballum	Arborea	Arborea
Ballum	Castellonis	Castelloni
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri	3522C
Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
Javanica	Poi	Poi
Louisiana	Louisiana	Salinem
Mini	Mini	Sari
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona
Pomona	Mozdok	5621
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Sejroe	M 84
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
Sejroe	Wolfi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
Semaranga*	Patoc	Patoc I

*Saprófita

Procedimentos da técnica

Diluição preliminar dos soros a 1:50.

Marcação das microplacas com os antígenos, as diluições, o número dos soros problema e as testemunhas (Figura 6.1), de acordo com o seguinte esquema:

- 1) Distribuição do soro diluído nos poços (1 gota) por cada antígeno presente, na linha A e B.

- 2) Distribuição do tampão: 1 gota, do poço 2 até à linha da testemunha (inclusive).
- 3) Execução das diluições seriadas (1:200 a 1:3200), com o auxílio da micropipeta multicanal, transferindo sempre igual volume da diluição anterior até à última diluição, na qual este volume é desperdiçado.
- 4) Adição de igual volume de antígeno (1 gota) a todas as diluições a testar e à testemunha da respetiva coluna.
- 5) Agitar cuidadosamente e cobrir com tampa.
- 6) Incubar na estufa a 37° C, durante 2 horas.

Após a incubação, retirar as placas da estufa e observar diretamente ao microscópio (adaptado com objetiva de longa distância focal) a existência de aglutinação, por comparação com a respetiva testemunha (controlo negativo).

Leitura das microplacas:

A intensidade da aglutinação, por campo de observação e por comparação com o respetivo controlo negativo, deve ser registada de acordo com o seguinte critério:

4+ = 75% ou mais de bactérias aglutinadas;

3+ = 50 a 75% de bactérias aglutinadas;

2+ = 25 a 50% de bactérias aglutinadas;

1+ = pequenos aglutinados ocasionais;

Negativo = ausência de aglutinação, com número de células idêntico ao do controlo.

Nota: Considera-se a reação positiva quando 50% ou mais das leptospiras estão aglutinadas, em regra, a partir da diluição mínima de 1:100.

DILUIÇÕES AO DOBRO	ANTIGÉNIO	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	
	SORO X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	100	A												
	200	B												
	400	C												
	800	D												
	1600	E												
	3200	F												
	...	G												
	Testemunha	H												

Figura 6.1. Esquema ilustrativo da marcação das placas para distribuição dos soros problema (soros X) em diluições seriadas e do Antígeno (Ag).

6.2.3. Testes de crescimento e morfologia sob diversas condições (abordagem fenotípica)

(Adaptado de: Gonçalves 2009 baseado nos métodos descritos por Jhonson & Rogers, 1964 e Auran, 1972)

Objetivo: Diferenciação preliminar da patogenicidade de isolados de *Leptospira* spp.

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

- ✓ Câmara de fluxo laminar e bico de Bunsen
- ✓ Incubadora a 13°C
- ✓ Incubadora a 29°-30°C, com agitação orbital
- ✓ Centrífuga
- ✓ Culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10⁸ bactérias/ml) das estirpes a identificar
- ✓ Meio de EMJH líquido - 5ml/tubo
- ✓ 8-azaguanina (Sigma[®])
- ✓ Solução de cloreto de sódio 1M

- ✓ Tubos eppendorf[®] de 1,5ml
- ✓ Tubos de vidro estéreis - 16 x 160 mm (Schott Duran[®])
- ✓ Pipetas Pasteur estéreis
- ✓ Descrição dos testes

a) Teste de crescimento com 8-azaguanina (225µg/ml)

Procedimentos

- 1) Preparar culturas jovens (4 a 10 dias) e densas (10^8 bactérias/ml) das estirpes a identificar;
- 2) Inocular 1ml de cada cultura em 5ml de meio EMJH líquido (Difco[®]);
- 3) Inocular 1ml de cada cultura em 5ml de meio EMJH líquido (Difco[®]) com 8-azaguanina (225µg/ml);
- 4) Colocar os tubos numa incubadora à temperatura de 29°C;
- 5) Efectuar a observação microscópica de 3 em 3 dias durante 15 dias.

Interpretação dos resultados

Culturas patogénicas: crescimento parcialmente inibido (+)

Culturas não patogénicas: crescimento normal (+++)

b) Teste do cloreto de sódio 1M

(Adaptado de Gonçalves, 2009; Método descrito por Auran e Col., 1972)

- 1) Centrifugar 1ml de uma cultura jovem (4 a 10 dias) e densa (10^8 cel./ml) a 10.000 g
- 2) durante 4 minutos à temperatura ambiente;
- 3) Descartar o sobrenadante;
- 4) Ressuspender em igual volume de NaCl 1M;
- 5) Aguardar 2-3 horas à temperatura ambiente;
- 6) Observar em microscópio de fundo escuro.

Interpretação dos resultados

Culturas patogénicas: leptospiras em forma esférica

Culturas não patogénicas: leptospiras com morfologia típica (normal)

6.2.4. Procedimentos para obtenção das amostras e cultura em meio seletivo de tecido renal dos roedores capturados

(Adaptado do protocolo em uso no laboratório do GLBL)

Material utilizado no trabalho de campo

Tabela 6.2. Material utilizado no trabalho de campo para captura, extração das amostras e cultura do tecido renal.

FINALIDADE	DESIGNAÇÃO	QUANTIDADE
Identificação da espécie	Fita métrica	1 unid
	Balança milimétrica	1 unid
	Prancha de dissecação	2 unid
	Máquina fotográfica	1 unid
	Ficha de registo	1 unid
Extração das amostras	Cabo de Bisturi	1 unid
	Lâmina de bisturi	1 cx
	Tesoura	1 unid
	Pinças	5 unid
	Separadores	1 unid
	Algodão	100 gr
	Alcool	500 ml
	Cloro	500 ml
Éter	100 ml	
Descarte / Inceneração	Sacos de plástico	20 unid
	Cubos de combustível	1 cx
	Fósforos	1 cx
Proteção individual (descartáveis)	Luvas	5 cx
	Gorros	1 cx
	Aventais	20 unid
Cultivo e acondicionamento das amostras	Bico de <i>Bunsen</i>	1 unid
	Caixa Térmica	2 unid
	Tabuleiro	2 unid
	Agulha e seringa	50 unid
	Sacos Stomacher®	50 unid
	Tubos de EMJH semi-sólido	75 unid
	Tubos de EMJH líquido	75 unid
	Tubos Eppendorf® (1,5ml)	150 unid
	Tubos secos (10ml)	50 unid
	Pipetas Pasteur	50 unid
"Pera" de sucção (pompete)	1 unid	

1. Saída de campo

1.1. Captura de pequenos mamíferos (roedores)

2. Laboratório

Os animais capturados serão transportados para o laboratório. É feita a eutanásia, punção cardíaca do sangue e necropsia para remoção dos rins para os procedimentos laboratoriais posteriores. Objetivos:

- ✓ Identificação dos animais capturados
- ✓ Cultura e acondicionamento das amostras extraídas

Protocolo de identificação e de necropsia

- 1) Anestésiar o roedor. Para tal introduzi-lo num saco de plástico, contendo algodão embebido em éter mas não em demasia
- 2) Pesar e medir o roedor, observar características anatómicas tais como tamanho e conformação do nariz, focinho, presença de pele interdigital, presença de tetas, prenhez, desenvolvimento dos órgãos sexuais e sexagem.
- 3) Colocar o roedor (em decúbito-dorsal) sobre uma prancha de dissecação, distender e fixar à prancha os membros anteriores e posteriores com ajuda de alfinetes.
- 4) Limpar muito bem a região ventral com algodão embebido em solução desinfetante
- 5) Com o auxílio de uma pinça e tesoura ou bisturi, fazer uma incisão na linha médio-ventral, inicialmente apenas ao nível do coração de forma a aceder ao mesmo no mais curto espaço de tempo
- 6) Com uma seringa retirar o sangue do coração e colocá-lo no tubo devidamente identificado, este será posteriormente centrifugado, de modo a recolher o soro.
- 7) Prosseguir com a incisão ao nível da linha médio-ventral, separar a camada epitelial superior e distende-la para os lados, fixando à prancha de dissecação com alfinetes.

- 8) Com um novo par de pinça/tesoura, previamente mergulhada em álcool a 70% fazer nova incisão ao nível da massa muscular e abrir para permitir o acesso aos órgãos internos. Observar se os pulmões possuem ou não pigmentação castanho-escura sugestiva de “pele de leopardo”, característica de infeção por *Leptospira* (indicador de [Fe] nos pulmões).
- 9) Antes de retirar os rins, desinfetar muito bem a tesoura e a pinça passando-as por álcool a 70% pela chama (lamparina)
- 10) Colocar o rins num saco de plástico estéril (já preparado previamente), contendo 10ml (ratinhos) ou 20ml (ratazanas) de *BSAD. Este processo deve ser feito junto à chama (em ambiente mais estéril)
- 11) Colocar o saco num suporte e tapado por um pano escuro

Nota: Centrifugar o sangue (após a retração do coágulo à temperatura ambiente durante um mínimo de 2 a 3 horas ou, se possível, na estufa a 37°C durante 1 hora) a 1800/2000 RPM durante 10 min.

Protocolo para as culturas de tecido renal

- 1) Deixar repousar o macerado dos rins em BSAD (soro de albumina bovina), durante aproximadamente 1 hora, pois as leptospiros são aeróbicas e tendem a migrar para a superfície do meio
- 2) Junto à chama, retirar com uma pipeta descartável uma porção de sobrenadante para um tubo de EMJH líquido (2,5ml), designado de (-1).
- 3) Agitar (-1) e proceder de imediato a uma segunda diluição em EMJH líquido (2,5ml) designado (-2). Deixar o tubo (-2) tapado com um pano escuro e a repousar pelo menos 1 hora.
- 4) Junto à chama, agitar (-2) e realizar a sementeira de algumas gotas (6/8 e 10/12 gotas) em dois tubos de EMJH sólido (A e B respetivamente)
- 5) Incubar os tubos A e B com agitação a 30°C (estufa). Após 24 horas e diariamente verificar o estado da cultura e agitar.

*Neste procedimento, o BSAD foi substituído por EMJH líquido enriquecido

6.2.5. Extração de DNA em amostras biológicas (soros e tecido renal)

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

- ✓ Câmara de fluxo laminar
- ✓ Termobloco
- ✓ Vortex
- ✓ Centrífuga
- ✓ Micropipetas
- ✓ Solução de Isopropanol
- ✓ Solução de etanol a 70%
- ✓ RNase
- ✓ Caixas de pontas estéreis com filtro
- ✓ Tubos eppendorf® de 1,5 ml (estéreis)

Nota: procedimentos de extração de DNA

O kit de extração utilizado para este estudo foi da marca Citogene® DNA Cell & Tissue (Citomed Lisboa, Portugal).

O protocolo de extração do DNA é parte integrante do Kit e compreende uma lista de procedimentos para cada tipo de amostra: sangue, soro, células ou tecido.

6.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

a) Utilização dos *primers* A e B

(Adaptado de: Vieira (2006), baseado na descrição de Mérien e Col., 1992)

Este ensaio permite a amplificação de DNA específico do género *Leptospira*, usando os *primers* A e B que correspondem, respetivamente aos nucleotídeos 38 a 57 e 348 a 368 na respetiva estrutura primária do gene *rrs* (16S) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3. Sequências oligonucleotídicas (*primers* A e B) usados para amplificação de DNA específico do género *Leptospira*.

Gene	<i>primer</i>	sequência	Fragmento amplificado
<i>rrs</i>	A	5' - GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG - 3'	331 pb
	B	5' - TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT - 3'	

A reação de amplificação foi realizada com o volume final de 50µl e constituída por 10mM Tris HCL, 2mM MgCl₂ (Bioline[®]), 1µM de cada *primers* (Tabela A9999), 200µM de cada dNTP - *deoxynucleoside triphosphate* (AMERSHAM[®]) e 1U de *Taq* polimerase (Bioline[®]). Foram adicionados 5µl de amostra alvo (*template*) e H₂O autoclavada para perfazer o volume final de 50µl. foi utilizado termociclador (BIO-RAD[®]) programados de acordo com as condições indicadas na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. Condições da PCR com os *primers* A e B.

Nº de Ciclos	Etapas da PCR	Temperatura °C	Tempo (')
1	Desnaturação	94	3,0
	Emparelhamento	63	1,5
	Extensão	72	2,0
29	Desnaturação	94	1,0
	Emparelhamento	63	1,5
	Extensão	72	2,0
	Extensão final	72	10,0

b) Utilização dos *Primers Hap1*

(Adaptado de: Vieira (2006), baseado na descrição de Branger e col., 2005)

Este ensaio permite a amplificação de DNA específico de leptospiras patogênicas, usando os *primers Hap1* tendo como alvo a estrutura primária do gene *hap1*, gene que codifica a proteína associada a hemolisina (Tabela 6.5).

Sequências oligonucleotídicas (*primers Hap1*) usados para amplificação de DNA específico de leptospiras patogênicas.

Tabela 6.5. Sequências oligonucleotídicas (*primers Hap1*) usados para amplificação de DNA específico de leptospiras patogênicas

Gene	<i>primer</i>	sequência	Fragmento amplificado
<i>hap1</i>	Forward	5'-GCTCTAGAATGAAAAAAGTTTCGATTTTGGC-3'	262 pb
	Reverse	5'-CGGGGTACCTTACTTAGTCGCGTCAGAA-3'	

A mistura (*mix*) para o PCR incluiu 2µl de DNA de cada amostra (template), 10µMol de *primers*, 100 mMol de dNTP (*deoxynucleoside triphosphate*) 50nM MgCl₂, 10x tampão, 5U *Taq* polymerase (Bioline[®], London, UK) para o volume final de 25µl. A mistura foi amplificada usando o termo-ciclador da Biorad[®] com ciclos e temperaturas descritos na Tabela 6.6.

Tabela 6.6. Condições da PCR com o *primers Hap1*.

	Etapas da PCR	Temperatura °C	Tempo
-	-	95	5,0 min
	Desnaturação	94	15 seg
45	Emparelhamento	56	35 seg
	Extensão	72	40 seg
	Extensão final	72	10 seg

c) Utilização do *primer* iRep1

(Adaptado de: Vieira, 2006 baseado na descrição de Barocchi, 2001)

É utilizado um único *primers* iRep1 (5'-AGC GGG TAT GAG TCC GC - 3') (Tabela 6.7), com o propósito de identificar o serogrupo dos isolados através da comparação do padrão dos fragmentos de DNA dos diferentes serogrupos de uma bactéria de referência e dos próprios isolados. Cada *mix* de PCR inclui 100-150ng de DNA leptospírico (estirpe de referência ou isolados), 100pmol de *primers*, 2.5 mM MgCl₂, 1 x *buffer* de PCR, 200µm de dNTP (*desoxynucleoside triphosphate*), 1 1U de *Taq* polymerase (Bioline, London, UK) para um volume final de 50µl.

Tabela 6.7. Sequências oligonucleotídicas (*Primer* iRep) usadas para amplificação de DNA de *Leptospira*.

	<i>primer</i>	sequência	Fragmento amplificado
-	iRep1	5'-AGC GGG TAT GAG TCC GC - 3	-

A mistura foi amplificada usando o termociclador da Biorad[®] com ciclos e temperaturas descritos na Tabela 6.8.

Tabela 6.8. Condições da PCR com *primers* iRep1.

	Etapas da PCR	Temperatura °C	Tempo
35	Desnaturação	94	5,0 mim
	Emparelhamento	94	30 seg
	Extensão	50	1,5 min
	-	72	4,0 min
	Extensão final	72	7,0 min

Nota:

Todos os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose (2%) em tampão 1x TAE (Tris-acetato EDTA) com coloração de 0.08µl/ de RedSafe™. Foram colocados em cada poço do gel, 5µl do produto amplificado aos quais se adicionou igual volume de tampão da amostra (*orange loading buffer*) e no primeiro poço o marcador de peso molecular (pb-pares de bases). A eletroforese decorreu a 130 volts, durante 40 minutos.

Foram visualizadas as posições do DNA (bandas), através de luz ultra-violeta, tendo sido utilizado o equipamento de análise da imagem e fotografia do gel “Dolphin - 1D” com o software Wealtec.

6.3. ARTIGO PUBLICADO

First Isolates of *Leptospira* spp., from Rodents Captured in Angola

Elsa Fortes-Gabriel,* Teresa Carreira, and Maria Luísa Vieira

Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisbon, Portugal

Abstract. Rodents play an important role in the transmission of pathogenic *Leptospira* spp. However, in Angola, neither the natural reservoirs of these spirochetes nor leptospirosis diagnosis has been considered. Regarding this gap, we captured rodents in Luanda and Huambo provinces to identify circulating *Leptospira* spp. Rodent kidney tissue was cultured and DNA amplified and sequenced. Culture isolates were evaluated for pathogenic status and typing with rabbit antisera; polymerase chain reaction (PCR) and sequencing were also performed. A total of 37 rodents were captured: *Rattus rattus* (15, 40.5%), *Rattus norvegicus* (9, 24.3%), and *Mus musculus* (13, 35.2%). Leptospiral DNA was amplified in eight (21.6%) kidney samples. From the cultures, we obtained four (10.8%) *Leptospira* isolates belonging to the Icterohaemorrhagiae and Ballum serogroups of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* genospecies, respectively. This study provides information about circulating leptospires spread by rats and mice in Angola.

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, with a recognized high incidence in tropical countries.¹ Rodents are the natural reservoirs of pathogenic leptospires and the main host responsible for its transmission to humans.^{2–4} Outbreaks of leptospirosis have been associated with high-level infestation of rodents, floods, and occupational activities. However, in many countries, morbidity and mortality due to leptospirosis are underestimated.^{1–4}

In Africa, few reports about human leptospirosis are available.⁵ In Angola, a serological survey was conducted by Baptista in 1991 in Huila province among cattle; this study revealed the presence of antibodies against *Leptospira interrogans* sensu lato in 35% of 1,518 animals analyzed (unpublished data). We recently performed a serological and epidemiological survey, in 650 febrile patients in Luanda and Huambo provinces. We found evidence of infection by *Leptospira* serovars belonging to Icterohaemorrhagiae, Pomona, and Ballum serogroups (E. Fortes-Gabriel, 2013, personal communication). Responses to questionnaires revealed that more than 50% of individuals surveyed had seen rodents near their houses. We now report a characterization of rodent *Leptospira* species in the Luanda and Huambo provinces.

We trapped rodents in February and April 2013 during the rainy season in Luanda (8°40'S and 13°40'E) and Huambo (12°45'S and 15°45'E) provinces, respectively (Figure 1). About 50 handmade live traps (Tomahawk type) were distributed randomly in 20 different urban and rural neighborhoods. Morphometric parameters of rodents were recorded to identify the species. Rodent kidneys were aseptically collected following biosafety and animal welfare guidelines.⁶

For culture, one kidney from each animal was homogenized in 10 mL Ellinghausen, McCullough, Johnson, and Harris (EMJH, Difco, BD Diagnostics, Sparks, MD) liquid medium, and 0.5 mL of the suspension was inoculated in EMJH semi-solid medium following incubation at 29°C. The other kidney was frozen at –20°C and stored for molecular assays.

Cultures and kidneys were transported to the Reference Laboratory for Leptospirosis at the Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (UNL). Cultivation was continued for 2 months at 29°C, and culture tubes were assessed every week by dark field microscopy.

Culture isolates were differentiated according to previously described methods,^{7,8} using two reference *Leptospira* serovars [Copenhageni (strain M20) and Patoc (strain PatocI)] as pathogenic and saprophytic controls, respectively. Cultures (10⁸ cells/mL) of each isolate were analyzed for: 1) growth at 13°C and 29°C; 2) growth in EMJH with and without 8-azaguanine 225 µg/mL; and 3) morphological modification to spherical forms in the presence of 1M NaCl. A microscopic agglutination test with six rabbit antisera for two of the major *Leptospira* serogroups (Icterohaemorrhagiae and Ballum), was also performed.

Genomic DNA from *Leptospira* isolates and kidney samples was extracted with a kit (Citogene®, Citomed, Lisbon, Portugal) in accordance with the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed targeting the *hapI* gene (also designated *lipL32*), which encodes a hemolysis-associated protein,⁹ and with the iRep1 primer (5'-AGC GGG TAT GAGTCC GC-3'),¹⁰ to compare DNA fingerprints patterns, with the 19 serogroups represented by 23 pathogenic serovars (*L. interrogans* sensu lato) and one saprophytic (*Leptospira biflexa*). Clustering and alignment of DNA sequences from the isolates was performed with ClustalW2/EMB/EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A phylogenetic tree was constructed with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 6,¹¹ using the neighbor-joining method, Jukes-Cantal model, and represents 1000 replicates with confidence greater than 50%.

Our study included 37 rodents collected at eight sites from urban and rural areas near households and garbage dumps (Figure 1) in Luanda and Huambo provinces. The rodents were predominantly adult females and identified as *Rattus rattus* (15, 40.5%), *Rattus norvegicus* (9, 24.3%), and *Mus musculus* (13, 35.2%).

Leptospires were successfully isolated from four (10.8%) rodents. These isolates, LDA02, LDA05, LDA10, and HBO34, were from *R. norvegicus* and *M. musculus* species, captured in Luanda and Huambo provinces, respectively. Pathogenic characteristics were demonstrated by phenotypic tests. All four isolates exhibited an agglutination titer of 1:3200 with rabbit antisera (Table 1).

*Address correspondence to Elsa Fortes-Gabriel, Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Rua da Junqueira No. 100, 1349-008, Lisboa, Portugal. E-mail: elsa.gabriel@ihmt.unl.pt



FIGURE 1. Schematic map showing the location of capture and respective rodent species distribution.

DNA from the four isolates was amplified, and the nucleotide sequences revealed a similarity of 100% with either *L. interrogans* or *L. borgpetersenii* (Table 1). DNA from the kidney samples was also amplified in eight (21.62%) out of a total ($N = 37$) of the samples.

When compared with 24 reference serovars, iRep-PCR results for our isolates showed a similarity between fingerprint patterns to either the Icterohaemorrhagiae or Ballum serogroups.

The four rodent isolates were assigned GenBank accession numbers LC006258, LC006259, LC006260, and LC006261. A phylogenetic tree (Figure 2) demonstrates consensus between the genospecies *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* (reference strains and/or homologous genospecies available in GenBank), and the nucleotide sequences from our isolates.

This study offers the first characterization of leptospires in rodents captured in Angola. Our findings confirm data from other countries, suggesting a close relationship between

rodents in the environment and the occurrence of human leptospirosis.^{12–15} Our field work was carried out during the rainy season, appreciating the importance of seasonality in predicting human infection risk due to an increase in leptospire survival during the rainy season.¹²

Our isolates of *Leptospira* spp., obtained from two of the three most abundant rodent species (*R. norvegicus* and *M. musculus*) in Angola, suggest that these small mammals are a primary infection source of leptospires among the human population. The isolates obtained were classified according to molecular assays as *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* genospecies and as belonging to Ballum and Icterohaemorrhagiae serogroups based on rabbit antisera. Results were consistent across all tests (phenotypic, serological, and genotypic).

Phylogenetic analysis revealed six *Leptospira* species partitioned into two clusters showing monophyletic groups. Similar results were describing of the *lipL32* gene.¹⁶ Therefore,

TABLE 1
Summary of isolates characterization by phenotypic, serological, and molecular tests

<i>Leptospira</i> isolates (rodent species)	Pathogenic status	Rabbit antisera serogroup (reciprocal titer)	iRep-PCR serogroup	PCR- <i>hap1</i> genospecies (GenBank accession no.)
LDA02 (<i>Rattus norvegicus</i>)	Yes	Icterohaemorrhagiae (1:3200)	Icterohaemorrhagiae	<i>Leptospira interrogans</i> (LC006258)
LDA05 (<i>R. norvegicus</i>)	Yes	Icterohaemorrhagiae (1:3200)	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> (LC006259)
LDA10 (<i>R. norvegicus</i>)	Yes	Icterohaemorrhagiae (1:3200)	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> (LC006260)
HBO34 (<i>Mus musculus</i>)	Yes	Ballum (1:3200)	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> (LC006261)

PCR = polymerase chain reaction.

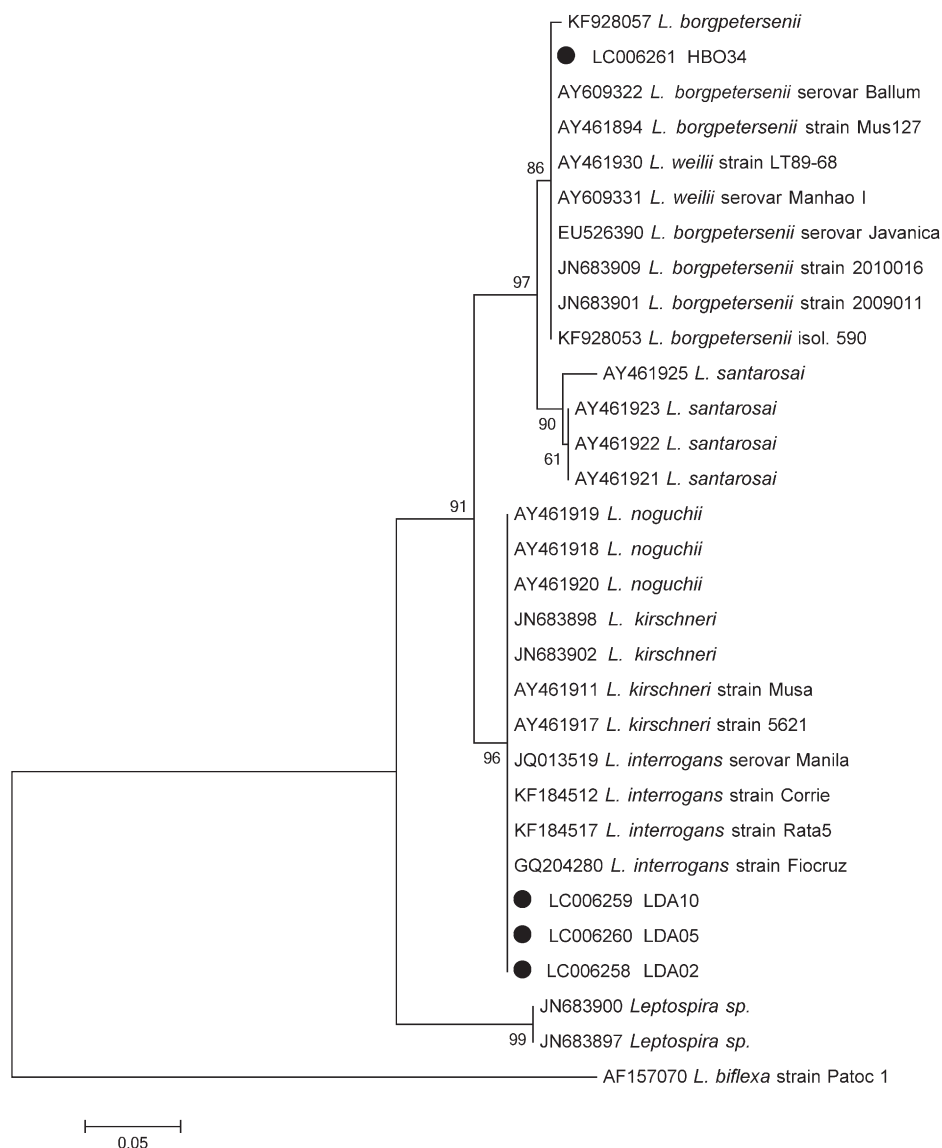


FIGURE 2. Phylogenetic tree based on partial *hap1* gene sequences from the isolates and the reference strains available in GenBank. Genospecies *Leptospira biflexa* was used as the out-group. Accession numbers of *Leptospira* spp. isolates: LC006258–LC006261.

the present study opens new perspectives on the knowledge of the patterns of *Leptospira* infection among rodents in Angola. Further studies of serovar diversity and rodent reservoirs in this country will be helpful.

Received January 12, 2015. Accepted for publication January 5, 2016.

Published online February 29, 2016.

Acknowledgments: We acknowledge the following Angolan institutions: Military Health Service/Angolan Armed Forces, Malaria Program/Ministry of Health, Institute of Veterinary Research/Ministry of Agriculture.

Financial support: The first author was supported by Angolan Armed Forces and through a fellowship awarded by the Calouste Gulbenkian Foundation (Portugal).

Authors' addresses: Elsa Fortes-Gabriel, Medical Microbiology Unit, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisbon, Portugal, and Angolan Armed Forces, Military Health Service, Luanda, Angola, E-mail: elsa.gabriel@ihmt.unl.pt. Teresa

Carreira and Maria Luísa Vieira, Medical Microbiology Unit, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisbon, Portugal, E-mails: t.carreira@ihmt.unl.pt and vieira@ihmt.unl.pt.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

REFERENCES

1. WHO, 2011. *Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group*. Geneva, Switzerland: WHO.
2. Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P, 2000. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *Eur J Epidemiol* 16: 1151–1157.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci, 272.

4. 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: 435–441.
5. De Vries SG, Visser BJ, Nagel IM, Goris MG, Hartskeerl RA, Grobusch MP, 2014. Leptospirosis in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Int J Infect Dis* 28c: 47–64.
6. Herbreteau V, Jittapalpong S, Rerkamnuaychoke W, Chaval Y, Cosson J-F, Morand S, 2011. *Protocols for Field and Laboratory Rodent Studies*. Bangkok, Thailand: Kasetsart University Press, 20–14.
7. Johnson RC, Rogers P, 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospirae with 8-azaguanine. *J Bacteriol* 88: 1618–1623.
8. Johnson RC, Harris VG, 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 94: 27–31.
9. Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, André-Fontaine G, 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 243: 437–445.
10. Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, Riley LW, 2001. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 39: 191–195.
11. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.
12. Holt J, Davis S, Leirs H, 2006. A model of leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop* 99: 218–225.
13. Jobbins SE, Sanderson CE, Alexander KA, 2013. *Leptospira interrogans* at the human-wildlife interface in northern Botswana: a newly identified public health threat. *Zoonoses Public Health* 61: 113–123.
14. Halliday JE, Knobel DL, Allan KJ, de C Bronsvort BM, Handel I, Agwanda B, Cutler SJ, Olack B, Ahmed A, Hartskeerl RA, Njenga MK, Cleaveland S, Breiman RF, 2013. Urban leptospirosis in Africa: a cross-sectional survey of *Leptospira* infection in rodents in the Kibera urban settlement, Nairobi, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 89: 1095–1102.
15. Houemenou G, Ahmed A, Libois R, Hartskeerl RA, 2013. *Leptospira* spp. prevalence in small mammal populations in Cotonou, Benin. *ISRN Epidemiol* 2013: 1–8.
16. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL, 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 186: 2818–2828.