

Telma Luísa Silva de Sousa

Deteção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* no ambiente: estudo na Área
Metropolitana do Porto

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Telma Luísa Silva de Sousa

Deteção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* no ambiente: estudo na Área
Metropolitana do Porto

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Deteção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* no ambiente: estudo na Área
Metropolitana do Porto

Telma Luísa Silva de Sousa

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção de grau de
mestre em Ciências Farmacêuticas

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (IBD) é uma patologia crónica inflamatória do intestino, resultante de uma resposta exacerbada do sistema imune, com duas principais variantes, que são a Doença de Crohn (CD) e a Colite Ulcerosa (UC). Há muito se suspeita que a bactéria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tem um papel preponderante no desenvolvimento da doença, e realmente MAP é detetada com mais frequência em amostras biológicas de doentes do que nos grupos controlo. No entanto, MAP não será o único agente etiológico, e acredita-se que doença é de carácter multifatorial. A prevalência de IBD está a aumentar globalmente, o que também é visível em Portugal, sendo o distrito do Porto recentemente apontado como um dos que tem maior incidência. Entre as várias fontes conhecidas de contaminação por MAP está a água, onde a bactéria é encontrada livre, aderida a sedimentos, ou no interior de amebas. Assim sendo, o foco deste trabalho foi avaliar a contaminação ambiental por MAP em amostras de água na Área Metropolitana do Porto. Este trabalho apresenta, primeiramente, um enquadramento teórico, sobre características da micobactéria em análise e sobre a IBD, seguida de uma parte experimental, compreendendo a deteção por PCR de MAP em água utilizada para consumo humano. A amostragem incluiu água de rede potável e águas de poço, bem como os respetivos biofilmes de várias residências. MAP foi detetada em 47%-55% dos biofilmes, em 32% de água potável de rede e ainda em 11%-39% de águas de poço, dependendo da altura da colheita. Estes resultados são concordantes com os anteriormente descritos na literatura e reforçam o papel do meio aquático como uma fonte de contaminação de MAP.

Palavras-chave

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*; Doença Inflamatória Intestinal; IS900; Nested PCR; biofilme; água potável

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic pathology of the intestine resulting from an exacerbated immune system response in the gut. It includes two main variants, Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) has long been suspected to play a major role in the development of the disease, and indeed MAP is detected more frequently in biological patient samples, rather than in the control groups. However, MAP is probably not the single etiological agent of IBD, since it is believed that the disease is multifactorial. The prevalence of IBD is increasing globally, which is also visible in Portugal, and Porto district was recently pointed as having one of the highest incidences in the country. Water is one of the several known sources of MAP contamination, where the bacteria is found free, adhered to sediments, or inside amoebas. Therefore, the focus of this work was to oversee the environmental contamination by MAP using water samples from the Metropolitan Area of Porto. This work presents, firstly, a theoretical approach on MAP characteristics and on IBD, followed by an experimental part, describing the PCR detection of MAP in water used for human consumption. Sampling included potable water, water from domestic wells and the corresponding tap biofilms. MAP was detected in 47% -55% of biofilms, 32% of drinking water, and 11% -39% of well water, depending on the time of the year when it was collected. These results agree with previous data from literature and highlight the role of the aquatic environment as a route of MAP contamination.

Keywords

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*; Inflammatory Bowel Disease; IS900; Nested PCR; biofilm; drinking water

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento não poderia deixar de ser à minha estimada orientadora, a Prof.^a Doutora Amélia Assunção, pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim, para que eu pudesse dar o meu contributo num projeto de investigação no qual devo dizer que tive muito gosto em participar. Obrigada pela orientação incansável, todo o acompanhamento e disponibilidade, por todos os ensinamentos que me passou, pela dedicação ao projeto, e mais do que isso, pela amabilidade e amizade com que sempre me brindou. Fui muito afortunada na escolha da minha orientadora!

Um agradecimento muito especial ao Prof. Doutor José Cabeda, pela imprescindível ajuda principalmente a nível laboratorial, toda a paciência e compreensão que teve comigo em todos os esclarecimentos, toda a prontidão e exemplo de empenho nos projetos que desenvolve.

À restante equipa de investigação, Prof.^a Doutora Cristina Abreu e Prof.^a Doutora Conceição Manso, por toda a estruturação e planeamento do projeto e toda a contribuição com amostras e sugestões importantes para o trabalho.

Aos professores que, não fazendo parte do projeto, me ajudaram a vários níveis e me acolheram no CEBIMED, com constante preocupação com o meu bem-estar e com o sucesso do meu trabalho, em especial a Prof.^a Doutora Maria Gil Ribeiro e a Prof.^a Doutora Márcia Carvalho.

Um sincero agradecimento ao Doutor Pedro Sarmiento, que não fazendo também parte do projeto, não hesitou em se disponibilizar para a elaboração dos mapas de resultados.

Agradeço a todas as pessoas das várias moradas selecionadas que aceitaram colaborar. Cada contribuição foi essencial para o projeto. Agradeço ao Sr. Miguel Costa e ao Sr. Ricardo Silva por toda a contribuição com várias amostras para o projeto e toda a ajuda no que diz respeito ao laboratório.

Às pessoas mais importantes que me rodeiam, os meus pais e a minha irmã, pelo apoio incondicional, pelas oportunidades todas que tive ao longo da vida na minha formação pessoal e académica, por todo o amor, carinho, segurança e dedicação durante toda esta fase.

A toda a restante família e amigos que me acompanharam, por todo o incentivo, por ser tão importante ter-vos sempre por perto! Em especial, obrigada por toda a ajuda e todas as palavras certas no momento certo, Mica, Barata, Gisela, Patrícia, Linda, Xelipa, Di, Juliana, Soninha, Titas, Susana, Moura, Isa e Tiago.

Àquela que foi a minha segunda casa nestes memoráveis 5 anos, a Universidade Fernando Pessoa, que tão bem me acolheu e onde fui tão feliz, bem hajam todos os professores pelos conhecimentos passados e principalmente pela forma acessível com que lidam com todos os alunos, que faz toda a diferença na nossa formação e preparação para o futuro. Saio preparada para o mundo de trabalho com a certeza de que escolhi o melhor lugar para me formar!

Obrigada a todos!

Índice

Resumo	i
Palavras-chave	i
Abstract.....	ii
Keywords.....	ii
Agradecimentos	iii
Índice	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
I. Introdução teórica.....	1
1. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1
1.1. Caracterização	1
1.2. Persistência e formação de biofilmes	2
1.3. Capacidade patogénica: Doença de Johne e Doença Inflamatória Intestinal (IBD).....	4
2. Caracterização da Doença Inflamatória Intestinal (IBD)	5
2.1. Quadro clínico e sintomas	5
2.2. Diferença entre Doença de Crohn e Colite Ulcerosa	5
2.3. Epidemiologia e fatores etiológicos	6

2.4. Imunopatologia.....	9
2.5. Tratamento	10
3. Possíveis vias de contágio de humanos com MAP.....	13
4. Objetivos do trabalho	15
II. Parte Experimental	16
1. Materiais e Métodos	16
1.1. Colheita e processamento de amostras.....	16
1.2. Extração de DNA	18
1.2.1. Filtros	18
1.2.2. Biofilmes.....	19
1.3. PCR em tempo real	20
1.3.1. Sequência a detetar e reagentes para amplificação	20
1.3.2. Preparação da mistura da reação.....	20
1.3.3. Condições usadas no PCR	21
1.4. Análise de dados e tratamento estatístico.....	22
2. Resultados.....	22
3. Discussão de Resultados.....	27
III. Conclusões.....	31
IV. Referências	32
V. ANEXOS.....	42
1. Anexo 1: Mapa da área em estudo: Concelhos do Distrito do Porto pertencentes à Área Metropolitana do Porto.	42

2.	Anexo 2: Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de água.	43
3.	Anexo 3: Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de biofilmes...	45
4.	Anexo 4: Protocolo para execução do <i>Real-Time</i> PCR.....	47
5.	Anexo 5: Protocolo para execução do <i>Real-Time Nested</i> PCR.....	48

Índice de Figuras

Figura 1:	Estrutura da parede celular de micobactérias.. ..	2
Figura 2:	Percentagens de deteção de MAP nas várias amostras.....	23
Figura 3:	Comparação dos resultados obtidos na figura 2.	23
Figura 4:	Resultados da distribuição geográfica de MAP nas águas de rede.....	24
Figura 5:	Resultados da deteção de MAP nas colheitas 1 e 2 das águas de poço	25
Figura 6:	Distribuição geográfica dos resultados dos biofilmes.. ..	26
Figura 7:	Comparação dos resultados referentes à totalidade de amostras de água.....	27

Índice de Tabelas

Tabela 1:	Caracterização das amostras incluídas no estudo.....	17
------------------	--	----

Lista de abreviaturas

6-MP	6-mercaptopurina
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteróides
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
ATG16L1	<i>Autophagy Related 16 Like 1</i>
AZA	Azatioprina
B.A.A.R.	Bactéria Álcool Ácido Resistente
CD	Doença de Crohn
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
Células Th	Células T auxiliares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GI	Gastrointestinal
IBD	Doença Inflamatória Intestinal
IFN-γ	Interferão-gama
ILC	Células Linfóides Inatas
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IS	Elementos de Inserção
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SSO	<i>Sso AdvancedTM Universal Inhibitor-Tolerant SYBR® Green Supermix</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
UC	Colite Ulcerosa

I. Introdução teórica

1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

1.1. Caracterização

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (**MAP**) é uma subespécie pertencente ao complexo *M. avium* (MAC), que engloba 3 outras subespécies: *M. avium* subsp. *hominissuis*, causador de doença pulmonar em humanos e em suínos; *M. avium* subsp. *avium*, e *M. avium* subsp. *silvaticum*, que causam uma doença similar à tuberculose em algumas aves. Os organismos pertencentes a MAC têm uma distribuição ubíqua, sendo encontrados em vários ecossistemas, como o solo, poeiras, vegetação e água, incluindo água salgada (Hilborn *et al.*, 2006; Guirado *et al.*, 2012). De um modo geral, o MAC compreende patogéneos intracelulares oportunistas, com tropismo para os macrófagos, conseguindo persistir no seu interior, evitando a ação do sistema imune do hospedeiro (Johnson *et al.*, 2014).

Os membros deste complexo são bactérias aeróbias, imóveis, não capsuladas, de morfologia bacilar, cocobacilar ou filamentosa (Kuenstner *et al.*, 2017; Oken *et al.*, 2017). Sendo micobactérias, possuem uma parede celular rica em lípidos (ver figura 1) – os ácidos micólicos – que lhes conferem resistência ao frio e ao calor, a pH ácido, à desidratação, à coloração de Gram, e a biocidas, sendo classificadas como Bactérias Álcool-Ácido Resistente (B.A.A.R.) (Johnson e Odell, 2014; Falkinham, 2018). São de crescimento lento, e para se fazer crescer em laboratório requerem o meio seletivo de *Lowestein-Jensen*, ou eventualmente outros meios solidificados à base de agar, como o 7H10 e 7H11 de *Middlebrook*. No entanto, é frequente a substituição destes meios por sistemas mais rápidos de cultura, como o método *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT), o método radiométrico *Bactec* e, mais recentemente, o uso de suplemento *TiKa* combinado com a cultura em MGIT (Bull *et al.*, 2017; Kehrmann *et al.*, 2016). MAP depende ainda da suplementação com um quelante de ferro que não é capaz de sintetizar - a micobactina J - para o seu crescimento *in vitro* (Behr and Kapur, 2008).

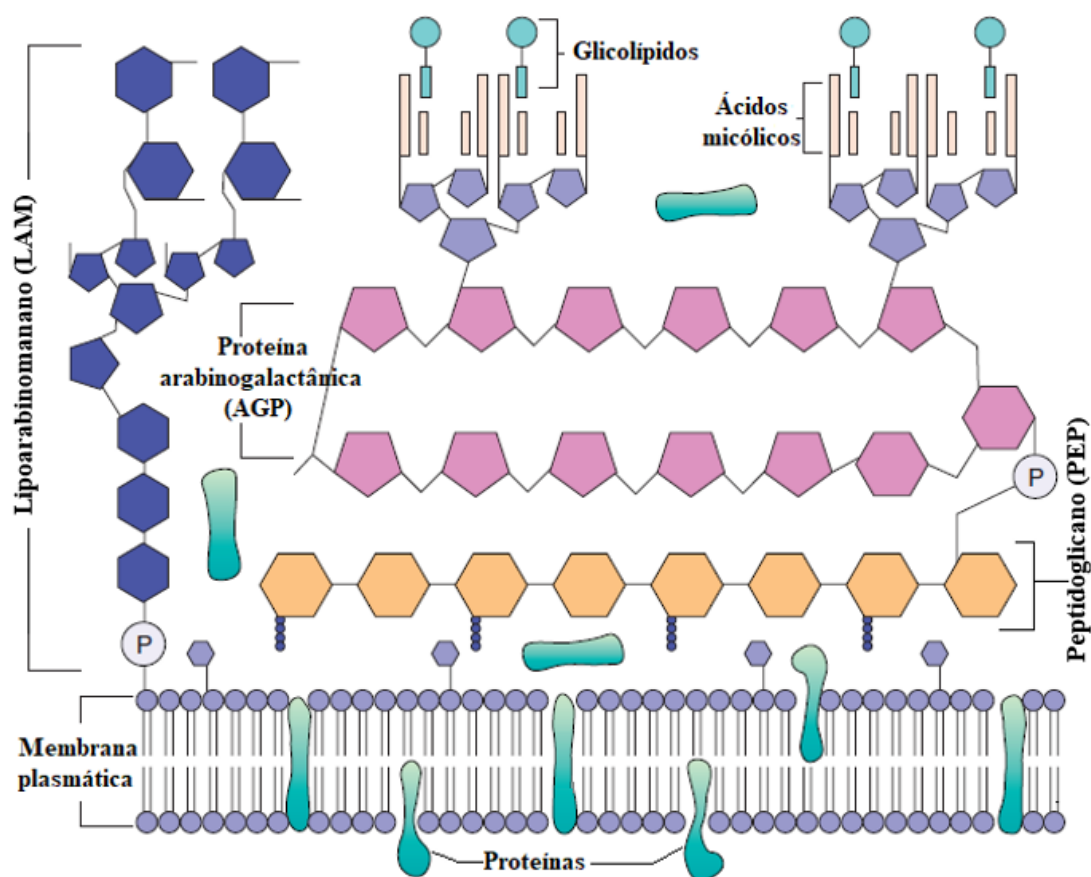


Figura 1: Estrutura da parede celular de micobactérias. Na figura é possível observar os ácidos micólicos à superfície (associados a glicolípidos), que fazem destas bactérias bacilos álcool-ácido-resistentes (B.A.A.R.), várias proteínas associadas ao plasma e à membrana plasmática, o lipoarabinomanano (LAM) e a proteína arabinogalactâmica (AGP) e ainda a camada de peptidoglicano (PEP). Adaptado de Murray *et al.* (2013).

1.2. Persistência e formação de biofilmes

Os ácidos micólicos da parede celular de MAP são responsáveis não só pela sua resistência a condições adversas e agentes químicos, mas também são a principal razão pela qual MAP consegue formar biofilmes (Falkinham, 2009). A formação de biofilmes constitui um fator de virulência que contribui largamente para a sua capacidade de persistência. Ao ser capaz de aderir a uma vasta variedade de materiais, MAP adquire uma resistência aumentada - não é lavada dos locais pelo caudal, e é isto que lhe permite

aumentar a sua sobrevivência (em sistemas de distribuição de água, por exemplo), apesar do seu crescimento lento (Falkinham, 2018). Esta bactéria já foi detetada em biofilmes de sistemas de água potável (Beumer *et al.*, 2010).

Bactérias do MAC cultivadas em biofilmes tratados mecanicamente para produzir suspensões de células individuais são significativamente mais resistentes a desinfetantes e antibióticos do que células cultivadas e expostas diretamente em suspensão. Mas esta resistência aumentada é adaptativa e transitória, dado que quando são cultivadas primeiramente em biofilme e depois ressuspensas, algumas horas depois são obtidas células com suscetibilidade a desinfetantes e antibióticos equivalente à obtida com o cultivo direto em suspensão (Steed e Falkinham, 2006; Falkinham, 2007).

Esta rápida perda da resistência antimicrobiana adaptativa poderá ser útil na eliminação de MAP, em que se poderá expor MAP a um desinfetante por um curto período de tempo, depois, cessar a sua aplicação - permitindo que a bactéria perca a resistência aumentada que o biofilme lhe confere - e, por último, aplicar novamente detergente. Esta estratégia poderá ser mais interessante do que o uso contínuo de detergente, já que a presença sistemática do agente agressor faz com que a resistência adaptativa se mantenha (Falkinham, 2018).

Os biofilmes constituem, no entanto, ambientes seletivos. As várias espécies de bactérias têm diferentes capacidades de formar biofilmes, não só em função da constituição do material a que estão a aderir, mas também em função da existência prévia de um biofilme microbiano. Ou seja, um biofilme já existente naquele local, pode promover, inibir ou não alterar a capacidade que uma outra bactéria terá de formar o seu próprio biofilme naquele local. O MAC compete pela aderência com o género *Methylobacterium*. Além disso, para ter capacidade inibitória da adesão de MAP, *Methylobacterium* não precisa de estar na sua forma viável. Como tal, poderá ser interessante a utilização de células inviáveis de *Methylobacterium* como probiótico em tubagens e em instrumentos médicos, para evitar a contaminação por MAP (Falkinham, 2018).

1.3. Capacidade patogénica: Doença de Johne e Doença Inflamatória Intestinal (IBD)

MAP é o agente etiológico da Doença de Johne, conhecida também como paratuberculose, em ruminantes e outros mamíferos, incluindo cães e primatas não humanos (Becker *et al.*, 2015). Trata-se de uma inflamação granulomatosa crónica no intestino destes animais, clínica e histologicamente semelhante à Doença Inflamatória Intestinal (IBD) em humanos (Elguezabal *et al.*, 2012).

Por este motivo, a bactéria MAP foi um dos primeiros microorganismos a ser sugerido como agente etiológico da IBD. Sempre foi associada principalmente à CD, embora recentemente também seja apontada como causa de UC (Pierce, 2010; 2018). Ainda hoje MAP é um dos possíveis agentes etiológicos mais apontado e discutido.

Em vários estudos foi verificada uma maior deteção de DNA de MAP e de anticorpos para esta bactéria em doentes com CD (Mann e Saeed, 2012; Friswell *et al.*, 2010; Kirkwood *et al.*, 2009; Naser *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2009; Nazareth *et al.*, 2015).

Ainda em concordância, a ocorrência de mutações no primeiro polimorfismo genético identificado como capaz de conferir suscetibilidade para o desenvolvimento de CD (gene *NOD2*) dá origem a uma resposta defeituosa a infeções bacterianas, e, possivelmente, a um reconhecimento/eliminação ineficaz de MAP a nível intracelular. Isto porque este gene codifica um recetor intracelular (a proteína *NOD2*) que reconhece muramíl dipéptido, um componente do peptidoglicano bacteriano, também presente em MAP (Becker *et al.*, 2015; Rosenfeld e Bressler, 2010; Ferwerda *et al.*, 2007; Dalal e Chang, 2014). Da mesma forma, a ocorrência de alterações no gene *ATG16L1* também está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de CD. Uma alteração neste gene, que codifica uma proteína necessária ao processo de autofagia, prejudica esse mesmo processo, permitindo que patogéneos intracelulares, como MAP, possam persistir nos macrófagos (Salem *et al.*, 2015; Kuballa *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010; Dalal and Chang, 2014).

Com base nas evidências encontradas, MAP poderá então ser uma bactéria zoonótica, transmitida através de alimentos contaminados. Esta bactéria tem uma distribuição ubíqua

pelo globo, tendo já sido detetada em vários produtos alimentares com que contactamos diariamente, designadamente água potável, carnes e laticínios. O consumo destes produtos expõe pessoas e animais diretamente à bactéria, o que pode justificar a associação de IBD a fatores ambientais, bem como a diferenças na incidência e distribuição geográfica da doença (Becker *et al.*, 2015).

Contudo, até à data, entre outras evidências, existem estudos que revelam não só deteção de DNA de MAP em grupos de controlo (Nazareth *et al.*, 2015), como também maior quantidade de DNA de MAP em indivíduos saudáveis (Elguezabal *et al.*, 2012; Juste *et al.*, 2008) e, como tal, a relação entre MAP e IBD gera ainda controvérsia.

2. Caracterização da Doença Inflamatória Intestinal (IBD)

2.1. Quadro clínico e sintomas

A Doença Inflamatória Intestinal (IBD) constitui uma doença gastroenterológica comum caracterizada principalmente por diarreia, dor abdominal, perda de peso e fadiga (SPED, 2017; Hospital Lusíadas, 2014). Trata-se de uma doença crónica, em que os sintomas não estão sempre presentes, havendo períodos de remissão. A IBD engloba, na verdade, várias expressões clínicas diferentes, dividindo-se principalmente em Doença de Crohn (CD) e Colite Ulcerosa (UC) (Head e Jurenka, 2003).

Os sintomas da IBD podem agravar ao longo do tempo, podendo levar a deficiências nutricionais, anorexia, anemia, ou cancro do cólon (Head e Jurenka, 2003).

2.2. Diferença entre Doença de Crohn e Colite Ulcerosa

A colite ulcerosa manifesta-se na camada que reveste internamente o **cólon (mucosa)**, fazendo com que esta apresente pequenas feridas que podem sangrar. A inflamação da mucosa pode ter extensão variável, desde apenas alguns centímetros do reto até todo o comprimento do cólon (SPED, 2017). No entanto, essas áreas de inflamação e ulceração são contínuas, não havendo regiões de tecido saudável (Head and Jurenka, 2003). Estas

úlceras levam ainda a uma produção maior de lubrificante intestinal, que pode ter conteúdo purulento (SPED, 2017).

Na doença de Crohn, a inflamação **não está limitada ao cólon**, podendo afetar qualquer parte do tubo digestivo, sendo toda a parede do órgão afetada, não só a mucosa. As zonas mais frequentemente afetadas são a porção terminal do intestino delgado e o intestino grosso (SPED, 2017) e existem tipicamente zonas de tecido normal/saudável entre regiões afetadas (Head e Jurenka, 2003).

A sintomatologia destas IBD é essencialmente a mesma, no entanto, a perda de peso e fadiga notar-se-ão mais na CD, porque além da perda de sangue, está ainda diminuída a capacidade de digestão e de absorção de nutrientes (Head e Jurenka, 2003).

2.3. Epidemiologia e fatores etiológicos

A IBD ainda é considerada uma doença dos países industrializados, surgindo com maior prevalência nas áreas urbanas, especialmente nos Estados Unidos e Europa (Head e Jurenka, 2003). No entanto, este dado tende a perder relevância no futuro, devido à intensa migração e pelo facto de que a incidência nos países menos desenvolvidos também está a aumentar (Bernstein, 2017). Afeta homens e mulheres na mesma proporção e há maior prevalência em caucasianos (Head e Jurenka, 2003; 2004). A IBD pode surgir em qualquer idade, sendo que a UC é detetada principalmente por volta dos 30 anos, ao passo que a CD é normalmente diagnosticada mais cedo, pela adolescência ou em jovens adultos (Head e Jurenka, 2004).

A história familiar é um fator de risco relevante nas duas IBD, mas será mais evidente na CD, onde 5 a 25% dos indivíduos afetados têm pais, filhos ou irmãos com alguma IBD e o risco aumenta substancialmente se os dois pais tiverem IBD (Head e Jurenka, 2004; Crohn's and Colitis Foundation, 2018).

A etiologia da IBD é complexa e não está completamente esclarecida, mas aceita-se como sendo multifatorial, onde fatores ambientais, predisposição genética e a reposta imune estão envolvidos (Nitzan *et al.*, 2016). Assim sendo, a doença surge em indivíduos com

predisposição genética, nos quais os fatores ambientais e agentes microbianos despoletam uma resposta imune exacerbada e crónica (Lapaquette *et al.*, 2012).

De facto, foram identificados mais de 100 *loci* de risco que estão relacionados com a probabilidade de desenvolver IBD, a maioria dos quais codifica proteínas envolvidas na imunidade, defesa do hospedeiro contra microorganismos, e homeostasia intestinal (Lapaquette *et al.*, 2012; Girardelli *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008).

Curiosamente, já desde há vários anos que se suspeita que também existe uma maior incidência de IBD em esquerdinos (Persson e Ahlbom, 1988). No entanto, o mecanismo responsável por esta associação não é ainda compreendido e os modelos explicativos propostos até aqui têm sido muito criticados (Morris *et al.*, 2001).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) já foram usados no tratamento da IBD, mas sabe-se agora que constituem um fator de risco e fator agravante da doença, podendo despoletar episódios agudos (Ananthkrishnan, 2013; Felder *et al.*, 2000), já que aumentam a permeabilidade intestinal, causam erosão do epitélio, e aumentam a probabilidade de hemorragias intestinais (Head e Jurenka, 2003; 2004).

O tabagismo aparenta ter efeitos contrários nas duas IBD. Os indivíduos que já foram fumadores apresentam maior risco de UC, e os tabagistas contínuos têm menor risco (ou seja, o tabagismo contínuo será um fator protetor para a UC). Em contraste, o tabagismo é um fator de risco para a CD e agrava também o decurso da doença (Bastida e Beltran, 2011; Head e Jurenka, 2004; Rang *et al.*, 2012).

A composição da microbiota intestinal ao longo da vida não é estocástica, mas sim resultante de fatores ambientais e determinações genéticas e epigenéticas que levam a variações na biodiversidade e quantidade de bactérias que a constituem. Quando há um desequilíbrio da composição da flora intestinal (disbiose), também os produtos do metabolismo destes microorganismos são alterados, com impacto nas células epiteliais da mucosa e tudo isto leva a que a resposta imune do hospedeiro seja automaticamente ativada (Dalal e Chang, 2014; Packey e Sartor, 2009). Por esse motivo, a disbiose está fortemente associada à IBD (Hansen *et al.*, 2010).

Isto explica um outro fator de risco há muito tempo associado à IBD, que é o uso recorrente de antibióticos na infância (Card *et al.*, 2004; Gilat *et al.*, 1987; Podolsky,

2002; Wurzelmann *et al.*, 1994) - o que é de esperar, já que os antibióticos alteram, sem dúvida, pelo menos temporariamente, a microbiota intestinal (Card *et al.*, 2004).

É natural que a alimentação tenha uma relevância particularmente importante numa afeção do intestino, por isso a **dieta** tem vindo a ser estudada continuamente como causa para a IBD. Estudos demonstram que pacientes com IBD consumiam, antes do diagnóstico, significativamente menos fruta, fibra e vegetais e mais hidratos de carbono, amido e açúcar refinado (Head e Jurenka, 2004). A dieta poderá afetar diretamente a microbiota, levando ao aparecimento de IBD, e têm sido sugeridos mecanismos para isso: podem existir antigénios nos alimentos capazes de produzir inflamação; a dieta poderá induzir a produção de metabolitos pelos organismos que vivem no intestino - metabolitos esses capazes de iniciar igualmente a cascata da inflamação; além disso, certos alimentos contendo, por exemplo, aditivos alimentares, podem ser agressivos para a mucosa, ficando o epitélio mais exposto e sensível ao conteúdo luminal (Lewis, 2016; Shivashankar e Lewis, 2017; Qin, 2012).

A infeção poderá ter um papel importante na IBD, já que os estudos têm vindo a demonstrar que as gastroenterites causadas por diferentes patogéneos (como bactérias, vírus, ou protozoários) podem predispor para o aparecimento de IBD (Hansen *et al.*, 2010).

Ao longo dos anos foram sugeridos vários agentes microbiológicos capazes de despoletar uma resposta inflamatória intestinal exacerbada, como vírus entéricos, *Archaea*, fungos, mas principalmente bactérias. Destas últimas, estirpes aderentes-invasivas de *Escherichia coli* e MAP têm sido mais consistentemente associadas com IBD (Ananthakrishnan *et al.*, 2017; Mann e Saeed, 2012; Hansen *et al.*, 2010).

Existem outros fatores associados fortemente à IBD, mas que são menos consensuais e requerem mais estudos, porque não estão compreendidos os seus mecanismos. São eles o *stress*, estados depressivos, uso de contraceptivos orais, medicação hormonal pós-menopausa e ainda níveis plasmáticos de vitamina D reduzidos (Ananthakrishnan, 2013).

2.4. Imunopatologia

O trato gastrointestinal (GI) está continuamente exposto a uma grande quantidade e variedade de antígenos. As células epiteliais do intestino, além da importante função de absorção seletiva de nutrientes, são o primeiro tipo de células a entrar em contacto com o ambiente externo, e, como tal, têm uma participação crucial na manutenção da homeostasia imunitária intestinal.

As células epiteliais fazem parte do sistema imune, não só pela função de barreira física, atribuída à robusta estruturação do epitélio, capaz de regular a passagem de moléculas, mas também pela capacidade de reconhecer antígenos - através dos seus recetores da imunidade inata - e de secretar moléculas antimicrobianas, citocinas e quimiocinas, que fazem a ponte entre as imunidades inata e adaptativa. Além disso, produzem a camada de muco que cobre todo o comprimento do trato GI, cuja função é reforçar a proteção da superfície da mucosa e a barreira intestinal (Pastorelli *et al.*, 2013).

Todos estes componentes da imunidade inata intestinal - a camada de muco, a barreira epitelial, a atividade citotóxica das células *Natural Killer* (NK) e a atividade fagocitária dos neutrófilos e macrófagos - são suficientes para proteger a mucosa da invasão de microorganismos patogênicos ou oportunistas, e, por outro lado, os monócitos e as células dendríticas são capazes de induzir tolerância às bactérias comensais e aos alimentos, sem ativar a resposta imune adaptativa das células T e B.

No entanto, o que acontecerá na IBD é que em indivíduos geneticamente suscetíveis, quando um presumível agente etiológico como possivelmente MAP penetra a barreira epitelial e persiste, consegue despoletar o desenvolvimento da fase de indução da resposta imune adaptativa, continuando para a fase efetora, que irá resultar numa inflamação aguda da parede intestinal, cuja severidade pode ser de diferentes graus (Kmiec *et al.*, 2017; Martini *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2017). Na resposta imune exacerbada que ocorre é importante não só o papel sobretudo dos linfócitos T, mas também de um tipo de linfócitos recentemente descoberto a que se deu o nome de células linfóides inatas (ILC). Estas células também participam na homeostasia imune do intestino, contribuindo favoravelmente para a tolerância às bactérias comensais, mas também para a imunopatologia da IBD. Ao contrário dos linfócitos T e B, as ILC não expressam

recetores de reconhecimento antigénico da imunidade adaptativa, sendo que a sua ativação não é conduzida pelo antigénio, mas sim por citoquinas. Uma vez ativadas, as ILC produzem interferão-gama (IFN- γ), que contribui para a persistência da inflamação no local (Li e Glover, 2018; Kmiec *et al.*, 2017).

A presença de MAP poderá despoletar a IBD, ou contribuir para agravar a inflamação da mucosa iniciada por outras causas (Johnson *et al.*, 2014). Esta hipótese é discutida desde que se verificou que a exposição via oral de MAP (sem colonização intestinal) é capaz de exacerbar a inflamação intestinal já instalada por deficiência na IL-10, em ratinhos (Singh *et al.*, 2007).

Devido à interferência de MAP com o sistema imune, surgem cada vez mais autores a associar MAP a várias outras doenças humanas classificadas como autoimunes, designadamente diabetes tipo I, artrite reumatóide, tiróide autoimune e esclerose múltipla. Estes autores defendem que o epítipo (determinante antigénico) de MAP será tão semelhante a determinantes auto-antigénicos do hospedeiro (Bitti *et al.*, 2012; Dow, 2012), que resultará numa reatividade cruzada do sistema imune, células hospedeiras e agente infeccioso – e será este estado global de inflamação que tem vindo a ser considerado de carácter autoimune (Garvey, 2018). Em concordância, as doenças autoimunes têm vindo a ser globalmente aceites como transtornos resultantes da presença de fatores ambientais em indivíduos geneticamente suscetíveis (Miller, 2011). É possível que esta hipótese também se aplique à IBD, embora mais estudos sobre estas hipóteses sejam necessários.

2.5. Tratamento

Os objetivos do tratamento usado na IBD, tendo em conta que se trata de uma doença crónica, passam por aliviar os sintomas na fase aguda da doença, aumentar o período de tempo entre as crises, impedir a progressão da doença e ainda evitar as complicações conhecidas, melhorando, assim, a qualidade de vida do doente.

Os **aminossalicilatos** são a classe de fármacos provavelmente mais associada à IBD. Permitem aumentar o período de remissão, devido à sua capacidade anti-inflamatória, ainda que o seu mecanismo de ação não esteja perfeitamente conhecido. A sulfassalazina

é o exemplo mais clássico, e trata-se, na verdade, de um pró-fármaco. A parte ativa é o ácido 5-aminossalicílico, que atua por um ou vários dos seguintes mecanismos propostos: inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos; eliminação de radicais livres; e diminuição da quimiotaxia (Rang *et al.*, 2012).

Nas fases agudas da doença, as grandes armas são os **glicocorticóides**, como a prednisolona. São muito eficazes em atenuar a inflamação e aliviar os sintomas agudos, e também em obter períodos de remissão. São usados como tratamento nos casos de doença moderada a severa, ou quando não há resposta às outras opções. O seu mecanismo de ação passa por interferir na transcrição de vários genes. Assim, conseguem restringir a produção de citocinas - entre as quais a interleucina 2 (IL-2) - e consequente multiplicação de células Th (T *helper*), bem como aumentar a síntese e libertação de proteínas anti-inflamatórias, tudo isto tanto na fase indutora como efetora da resposta imunológica. No entanto, os seus conhecidos efeitos secundários - aumento de peso, alterações de humor, retenção de líquidos, risco a longo prazo de cataratas, glaucoma e osteoporose (Head e Jurenka, 2004) – fazem com que seja insustentável o seu uso contínuo. A budesonida é outro fármaco desta classe, desenhada inicialmente para uso tópico. Quando usado via oral, sofre efeito de primeira passagem hepática, e, como tal, tem menos efeitos adversos e tem vindo a ser usado como alternativa, especialmente em crianças (Feldman *et al.*, 2007).

Usam-se ainda outros **imunomoduladores**, designadamente a 6-mercaptopurina (6-MP) e o seu pró-fármaco, azatioprina (AZA), para casos dependentes ou refratários a corticóides (Feldman *et al.*, 2007). O seu mecanismo de ação está relacionado com a capacidade de minorar as reações imunológicas do tipo celular e as mediadas por anticorpos na fase indutora da resposta imunológica, por ação citotóxica nas células em divisão, bem como diminuição da ação das células *Natural Killer* (NK) (Head e Jurenka, 2003; Rang *et al.*, 2012). Os resultados terapêuticos só são visíveis após alguns meses de utilização, e, como tal, não têm utilidade em fases agudas (Feldman *et al.*, 2007).

Nos casos de doença grave não responsiva a glicocorticóides e imunomoduladores, já têm sido usados **anticorpos monoclonais**, como o infliximab e adalimumab. A nível de mecanismo de ação, estes fármacos têm como alvo o fator de necrose tumoral TNF- α , nas células inflamatórias mononucleares, neutralizando-as por indução da apoptose (Head e Jurenka, 2004).

São ainda usados **antibióticos** no tratamento da IBD, pelo facto de que a microbiota intestinal tem um papel importante no desenvolvimento da doença (Nitzan *et al.*, 2016). Assim sendo, os antibióticos podem alterar o curso da doença por alteração direta da composição da microflora, mas, além disso, podem ter como alvo terapêutico bactérias específicas que têm vindo a ser associadas à etiologia da doença, especialmente da CD (Nitzan *et al.*, 2016). Os mais usados serão a ciprofloxacina, metronidazol (estes dois usados por vezes em combinação), rifaximina, e claritromicina. O seu mecanismo de ação passa por interferir na síntese e degradação do DNA bacteriano, fazendo com que a bactéria seja eliminada ou pare o seu crescimento (Rang *et al.*, 2012). É de grande importância que estes fármacos não sejam usados quando não são realmente necessários, porque embora tenham resultados satisfatórios até em manter períodos de remissão, o uso recorrente ou prolongado tem efeitos secundários muito relevantes, como a intolerância ao tratamento, infeções secundárias e desenvolvimento de resistências na flora intestinal. A terapêutica com antibióticos é feita especialmente em situações de pós-operatório, como prevenção de recidivas (Nitzan *et al.*, 2016).

Outra das opções de tratamento é precisamente a **resseção cirúrgica**, indicada nos casos que não respondem às restantes alternativas, em que os efeitos secundários da medicação se tornem intoleráveis, sintomas não controlados (por exemplo, perda de peso excessiva), alto risco de recidiva, ou ainda em caso de aparecimento de complicações que requerem intervenção urgente (como hemorragia abundante, obstrução ou perfuração intestinal, formação de abscesso e megacólon tóxico). É de notar que a cirurgia faz parte do tratamento contínuo nos doentes, não é uma cura para a doença - tem como objetivo conservar o intestino e dar ao doente a melhor qualidade de vida possível, tal como as restantes abordagens terapêuticas (APDI, 2012).

A **dieta** é importante como fator de risco, mas tem um papel igualmente importante para tratamento de IBD (Wu *et al.*, 2013). Assim sendo, a correção de hábitos alimentares e o acompanhamento por um nutricionista é importante, especialmente considerando as já referidas deficiências nutricionais, perda de peso e alterações no apetite causadas pela doença.

Como já foi mencionado, a microbiota tem um papel fundamental no aparecimento e decurso da IBD. Tal como os antibióticos e a dieta, também suplementos do tipo **probióticos** e **prébióticos**, ou mesmo **transplantes fecais** têm a capacidade de alterar

essa microbiota (Nitzan *et al.*, 2016) e, por esse motivo, fazem parte das opções do tratamento das IBD.

Devido à possível ligação entre o tabagismo e a proteção contra a UC, tem vindo a ser testado o uso de nicotina via transdérmica como adjuvante terapêutico. Nem sempre os resultados são significantes, mas têm demonstrado concordância quanto à utilidade da nicotina pelo menos no alívio de um dos principais sintomas da IBD, que são as dores abdominais (Norton *et al.*, 2017).

O conhecimento da imunopatologia da IBD é fundamental no desenvolvimento de novas terapias. Após a apresentação antigénica pelas células apresentadoras de antígeno (APC) aos linfócitos T *naive*, estes sofrem maturação e proliferação em células memória e células efetoras, que entram em circulação. Para que estas células tenham atividade no local onde se encontra o antígeno, têm de expressar moléculas de adesão (como as integrinas), que vão interagir com os seus ligandos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, de forma a dar início à inflamação naquele local. O bloqueio destas interações entre as integrinas e os seus ligandos tem sido uma estratégia introduzida na terapêutica de pacientes com IBD (Kmiec *et al.*, 2017).

3. Possíveis vias de contágio de humanos com MAP

O consumo de **carne** ou **laticínios** são vias sugeridas como veículos de transmissão de MAP entre o gado e os humanos. Quanto ao leite, sabe-se que os animais afetados clínica e subclínicamente por MAP libertam a micobactéria intermitentemente através do leite e das fezes (Bharathy *et al.*, 2017; Patel e Shah, 2011). Os estudos demonstram que nos procedimentos convencionais de pasteurização, a bactéria MAP não é completamente erradicada do leite (Waddell *et al.*, 2016).

Além disso, é possível que o produto final que chega a consumo humano após abate e processamento da carne contaminada, seja uma fonte de infeção por MAP, não só em matadouros não autorizados, mas também em grandes indústrias (Singh *et al.*, 2010; Savi *et al.*, 2015).

A presença de MAP em **água** para consumo humano ou recreação, também pode ser uma fonte importante de contágio. É de esperar a presença de MAP em **água potável**, já que por um lado, a resistência destas micobactérias a antibióticos e desinfetantes, nomeadamente a já comprovada resistência à desinfeção por cloro (Whan *et al.*, 2006), contribui para a sua persistência após tratamento convencional da água; depois, as fezes de animais afetados podem contaminar águas superficiais usadas como fonte de água potável (Pickup *et al.*, 2006); a sua já mencionada capacidade de formar biofilmes, faz com que possa subsistir nas tubagens e sistemas de distribuição; e um último motivo para ser considerada a água potável como fonte de contágio de MAP é que outras subespécies de MAC já foram detetadas em sistemas de distribuição de água potável, incluindo sistemas de água potável quente (Falkinham *et al.*, 2001; Hilborn *et al.*, 2006).

MAP, especificamente, pode surgir em água na sua forma livre, aderida a sedimentos, ou no interior de amebas (Samba-Louaka *et al.*, 2018) e já foi encontrada em rios, barragens e águas superficiais usadas como fonte de água potável em vários países. No Reino Unido, MAP foi detetada em 69% do total de amostras de água de rio colhidas duas vezes por semana durante 8 meses (Pickup *et al.*, 2006). Num outro rio da mesma região, MAP foi positiva em 32% das amostras colhidas diariamente durante 96 dias (Pickup *et al.*, 2005). Num outro estudo também no Reino Unido, usando água de rios e de lagos, MAP foi encontrada em 29-58% das amostras (Aboagye e Rowe, 2011). Em águas superficiais, MAP foi positiva em 2% de amostras obtidas em calhas de água na Eslováquia, 17%-38% nos Estados Unidos, e em 17% de águas de escoamento na Austrália (Waddell *et al.*, 2016). No Reino Unido, MAP foi pesquisada em água não tratada por 3 métodos diferentes ao longo de um ano em 9 estações de tratamento, sendo que 8% das amostras recolhidas foram positivas para pelo menos um dos métodos usados (Whan *et al.*, 2005).

Quanto à sua presença em água potável, nos últimos anos, já foi efetivamente detetada através de PCR a partir de águas de rede municipais em vários países. Em áreas metropolitanas da região centro-oeste dos Estados Unidos, MAP foi encontrada em 81-88% das amostras de água potável colhidas em casas e edifícios comerciais e em 76% dos biofilmes colhidos (Beumer *et al.*, 2010) – e mais tarde, em biofilmes de torneiras de água potável, MAP foi detetada em 11,8% das 51 amostras colhidas (Chern *et al.*, 2015). Num outro estudo em estações de tratamento de água em todo o território dos Estados Unidos, MAP foi detetada em água potável em 13% das estações de tratamento (King *et*

al., 2016). Em Itália, um estudo realizado em hospitais públicos e privados detetou MAP em 3,3% das amostras de água potável recolhidas (Pistone *et al.*, 2012).

Segundo uma revisão recente da literatura por Waddell e colaboradores, a **prevalência de MAP em água** (tanto potável como não potável) detetada via PCR nos vários estudos incluídos é, em média, de **23%** (Waddell *et al.*, 2016).

O isolamento de MAP recorrendo a meios de cultura, a partir de água ou biofilmes, é um processo trabalhoso, dado que MAP é uma bactéria fastidiosa, demorando semanas para crescer *in vitro*, mesmo com adequada suplementação dos meios com nutrientes, *cocktails* de antibióticos e Micobactina J. Assim sendo, o sucesso do isolamento *in vitro* será dependente do tipo e concentração de descontaminantes usados, do meio de cultura escolhido, tempo de exposição e método de eluição da bactéria, incluindo o tamanho do poro do filtro (Aboagye e Rowe, 2018; Klanicova *et al.*, 2012). Nos vários estudos que comparam a deteção de MAP no ambiente por cultura e PCR, existem amostras que são negativas pelo método de cultura, mas que são positivas usando PCR (Espeschit *et al.*, 2018; King *et al.*, 2016). No entanto, a utilização dos métodos de cultura é importante, dado que os métodos de PCR não dão uma indicação direta da viabilidade da bactéria (Garvey, 2018). Um estudo recente que compara a deteção de MAP (a partir de amostras biológicas, e não água) por cultura através do meio *TiKa-MGIT* (anteriormente referido) e por PCR, demonstrou que aquele método de cultura apresenta uma sensibilidade satisfatória e semelhante à do PCR (Bull *et al.*, 2017).

4. Objetivos do trabalho

Em Portugal a prevalência de IBD está a aumentar, destacando-se o distrito do Porto como um dos distritos com maior incidência (Azevedo *et al.*, 2010). Em trabalho realizado previamente verificou-se uma elevada prevalência de DNA de MAP no sangue dos doentes com IBD (positividade para MAP em 56% doentes com CD e 43% doentes com UC), embora também tenha sido detetado em controlos, como já referido (38% de positividade) (Nazareth *et al.*, 2015). No entanto, até agora, não foi realizado qualquer estudo no país visando a deteção de MAP no ambiente, que presumivelmente constitui

uma importante fonte de contaminação e infeção, que, por sua vez - como discutido até aqui - poderá contribuir para o desenvolvimento de IBD, em indivíduos suscetíveis.

Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a contaminação por MAP em águas para consumo humano e águas domésticas não tratadas em concelhos da Área Metropolitana do Porto incluídos no Distrito do Porto. Foi também avaliada a presença de MAP nos biofilmes das tubagens nos pontos de colheita das várias amostras. Este constitui o primeiro trabalho de deteção de MAP no ambiente realizado em Portugal, que poderá contribuir com novos dados que conduzam para a melhoria dos cuidados de saúde pública.

II. Parte Experimental

1. Materiais e Métodos

1.1. Colheita e processamento de amostras

A amostragem foi realizada em 19 pontos de água de rede e 18 pontos de água de poço, tendo sido também colhidos os respetivos biofilmes (Tabela 1). As colheitas foram efetuadas durante o mês de outubro de 2017 (colheita 1, poços e rede). As moradas foram selecionadas de forma aleatória, maioritariamente na Área Metropolitana do Porto pertencente ao Distrito do Porto e as amostras gentilmente cedidas pelos responsáveis das casas que aceitavam contribuir para o projeto. Para que isto fosse possível, o projeto teve a aprovação da Comissão Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Os mapas da Área Metropolitana do Porto e do Distrito do Porto estão incluídos no Anexo 1.

As amostras de água de rede e de poço foram colhidas diretamente da torneira para um frasco estéril de 1L (VWR, USA), após rejeição do jato inicial, e os biofilmes foram obtidos através de raspagem do interior da torneira com zaragatoa, mergulhada de seguida num tubo *falcon* estéril contendo cerca de 1mL de água ultra-pura livre de DNase e RNase (Thermo Fisher, USA).

Tabela 1: Caracterização das amostras incluídas no estudo. Colheita 1: colheita realizada no outono, antes da estação chuvosa; colheita 2: colheita realizada no inverno, durante a estação chuvosa.

Tipo amostra	Nº de amostras	Concelho	Nº amostras por concelho	
Rede Pública	19 (colheita única)	Gaia	3	
		Gondomar	3	
		Matosinhos	3	
		Paredes	1	
		Porto	4	
		Trofa	1	
		Valongo	4	
				Colheita 1
Poço	18 (colheita 1)	Amarante	2	0
		Gondomar	3	1
		Paredes	3	3
	13 (colheita 2)	Paços de Ferreira	2	2
		Trofa	4	4
		Valongo	4	3

Quando possível, as amostras de água dos poços foram colhidas uma segunda vez em janeiro/fevereiro de 2018, durante a estação chuvosa (colheita 2). Os biofilmes foram colhidos apenas uma vez, em outubro.

No prazo máximo de 24h após a colheita, as amostras foram processadas em laboratório.

Água: cada amostra de água foi filtrada a vácuo utilizando funis de filtração estéreis com filtros de porosidade 0,45 µm (Pall Corporation, USA). Os filtros foram colocados nos *bead-tubes* fornecidos com *DNeasy® PowerWater® Kit* (Qiagen, Alemanha) e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

Biofilmes: após lavagem na água ultra-pura, a zaragatoa em cada tudo foi rejeitada e os tubos foram centrifugados a 13000g durante 1 minuto. Os sobrenadantes (SN) foram desprezados, e os *pellet* resultantes foram congelados a -20°C até à extração de DNA.

1.2. Extração de DNA

1.2.1. Filtros

Toda a extração de DNA dos filtros foi feita recorrendo aos reagentes e procedimentos do kit DNeasy® PowerWater® (Anexo 2).

Descongelaram-se inicialmente os tubos contendo as *beads* em contacto com os filtros obtidos. A este tubo é adicionado um reagente capaz de lisar a parede celular e de remover material orgânico e não orgânico que não seja DNA. O tubo foi primeiro aquecido - de forma a usar a temperatura como adjuvante no processo de lise, visto tratar-se de uma micobactéria - e depois agitado em vórtex.

Seguiu-se uma centrifugação, onde foi aproveitado o sobrenadante (SN) para continuar a purificação. O *pellet*, contendo as *beads*, é rejeitado, juntamente com o filtro.

O SN obtido foi centrifugado, para remoção das *beads* remanescentes, proteínas e detritos celulares, rejeitando-se o *pellet*.

As etapas seguintes foram para purificação do DNA através de uma membrana filtrante. Para isso adicionou-se ao SN uma solução salina concentrada, já que o DNA se liga à sílica da membrana se estiver em meio concentrado, ficando aprisionado na membrana. Esta mistura é centrifugada, rejeitando-se o filtrado.

Adicionou-se depois uma solução à base de álcool para remover o excesso de sal e outros contaminantes, mas permitindo que o DNA se mantenha ligado à sílica. Centrifugou-se e rejeitou-se o filtrado.

De seguida aplicou-se etanol, para retirar completamente os resíduos do reagente anterior, centrifugando-se duas vezes para remover também o excesso de etanol, que poderia depois interferir com o PCR, rejeitando-se o filtrado pela última vez.

O último reagente adicionado é um tampão de eluição estéril, que tem a função de humedecer a membrana, e, através da sua passagem pela membrana, este reagente é capaz de separar eficazmente o DNA da sílica, fazendo com que o DNA transite para o filtrado.

Proseguiu-se com uma última centrifugação, em que o filtrado contém agora todo DNA da amostra inicial de água, pronto para amplificação em PCR. Neste caso, o DNA resultante da extração foi mantido congelado a -20°C até realização do PCR.

1.2.2. Biofilmes

Os *pellets* obtidos anteriormente foram descongelados e a extração de DNA foi feita recorrendo ao kit DNeasy® PowerBiofilm® (Anexo 3).

O biofilme foi ressuspenso no detergente do kit capaz de lisar a parede celular, mas estabilizando o DNA e protegendo-o da degradação. Depois do detergente, foi adicionado um agente caotrópico para contribuir para a lise, e esta mistura foi aquecida e agitada em vórtex pelo mesmo motivo.

Seguidamente adicionou-se um reagente que teve a função de alterar o pH, fazendo com que as macromoléculas insolúveis precipitassem, eliminando assim polissacáridos, polifenóis, detritos celulares, ácido húmico, contaminantes orgânicos e não orgânicos, sendo que os ácidos nucleicos não precipitam. A mistura foi centrifugada, rejeitando-se o *pellet*.

Ao SN foi adicionada uma solução salina concentrada, mais uma vez permitindo a ligação do DNA à membrana filtrante usada em seguida.

Esta mistura foi então filtrada com a membrana de sílica, através de uma centrifugação, rejeitando-se o filtrado.

Para remover os resíduos do reagente anterior, aplicou-se etanol na membrana e fez-se uma nova centrifugação, rejeitando-se o filtrado. Como o etanol residual deve igualmente ser removido, fez-se uma segunda centrifugação após a sua aplicação.

Por último, fez-se passar pela membrana um tampão de eluição estéril, mais uma vez permitindo a quebra da ligação entre o DNA e a sílica, que após centrifugação fará com que o DNA passe para o filtrado, que assim ficou pronto para ser usado em PCR. O DNA obtido foi igualmente congelado a -20°C até realização do PCR.

1.3. PCR em tempo real

1.3.1. Sequência a detetar e reagentes para amplificação

O elemento de inserção (IS) IS900 é um elemento genético móvel característico de MAP e altamente específico para a sua deteção (Bharathy *et al.*, 2017). É o alvo mais usado para identificação de MAP, e foi o alvo escolhido para ser detetado nos PCR deste estudo.

Nesse sentido, os *primers* usados para PCR correspondem a sequências já conhecidas para amplificação de IS900. Realizou-se ainda PCR *Nested* em tempo real, para maior sensibilidade de deteção. Para o 1º PCR foram usados os *primers* **L1** (5'-CTT TCT TGA AGG GTG TTC GG-3') e **L2** (5'-ACG TGA CCT CGC CTC CAT-3'). No 2º PCR (*Nested* PCR), aplicaram-se os *primers* **AV1** (5'-ATG TGG TTG CTG TGT TGG ATG G-3') e **AV2** (5'-CCG CCG CAA TCA ACT CCA G-3'), usando como *template* produto obtido da primeira amplificação, ou seja, do 1º PCR (Pickup *et al.*, 2005).

Além dos *primers*, foi usado o reagente *Sso AdvancedTM Universan Inhibitor-Tolerant SYBR® Green Supermix* (SSO), (BIORAD, USA) que contém todos os componentes necessários para o qPCR incluindo a enzima, os nucleótidos e um marcador fluorescente capaz de detetar a amplificação (SybrGreen).

1.3.2. Preparação da mistura da reação

A mistura reacional foi preparada em sala limpa. Os *primers* L1 e L2, o SSO e a água ultra-pura usada para completar o volume foram descongelados e misturados num *epENDORF* nas quantidades calculadas. A mistura foi agitada em vórtex brevemente, evitando a formação de espuma causada pelo SSO, e depois distribuída por cada capilar.

Ao primeiro capilar foi ainda adicionada água ultra-pura, correspondendo ao controlo negativo da reação. O suporte de capilares foi transportado para uma câmara de fluxo laminar, previamente irradiada. Na câmara de fluxo, os capilares, exceto o controlo negativo, foram preenchidos com as amostras de DNA e selados de imediato. O controlo negativo foi sempre o último capilar a ser selado.

Os capilares ficavam, desta forma, prontos para correr em *LightCycler* 1.1 (Roche, Suíça).

Todo o procedimento, reagentes e controlos para a preparação da mistura reacional da segunda corrida, *Nested* PCR, foram idênticos, exceto os *primers* usados, pois neste 2ºPCR foram usados os *primers* AV1 e AV2, e as amostras consistiram no produto do 1ºPCR, como já mencionado.

1.3.3. Condições usadas no PCR

Os protocolos usados nos PCR estão disponíveis nos Anexos 4 e 5.

As condições de corrida usadas no primeiro PCR foram as seguintes: um ciclo de 95°C durante 3 minutos, para ativação da enzima; 25 ciclos de amplificação (95°C, 15 seg; 58°C, 15 seg; 72°C, 30seg, e 85°C, 5seg); 1 ciclo de *melting* (95°C, 15seg; 47°C, 15seg; 96°C-ramp=0.2°C/s); 1 ciclo de 30°C durante 30seg, para arrefecimento.

Já para o *Nested* PCR, é feito um ciclo de 95°C durante 3 minutos, para ativação da enzima; 40 ciclos de amplificação (95°C, 15 seg; 62°C, 15 seg; 72°C, 20seg); 1 ciclo de *melting* (95°C, 15seg; 47°C, 15seg; 96°C-ramp=0.2°C/s); 1 ciclo de 30°C durante 30seg, para arrefecimento.

Os PCR em tempo real foram realizados recorrendo ao equipamento *LightCycler* 1.1 (Roche, Suíça).

1.4. Análise de dados e tratamento estatístico

Os resultados estão apresentados sob a forma de gráfico, obtidos através do *software GraphPad Prism®* versão 7. Este programa informático permite igualmente fazer a análise estatística, que consistiu no teste do Qui-quadrado e obtenção do valor de significância (p) pelo *fisher's exact test*.

Os dados obtidos foram ainda usados num outro *software* informático, *QGIS*, de forma a perceber se existia uma relação entre a zona geográfica de onde foram colhidas as amostras e a quantidade de amostras positivas, identificando possíveis *clusters* de contaminação.

2. Resultados

A amostragem incluiu 7 dos 11 concelhos da Área Metropolitana do Porto pertencentes ao Distrito do Porto. Foram também incluídas amostras de Paços de Ferreira e Amarante, que são municípios pertencentes ao Distrito do Porto mas não à área metropolitana (Anexo 1).

As frequências de deteção de MAP nas amostras colhidas estão apresentados nas figuras 2 e 3. MAP foi detetada em 2 das 18 (11%) amostras de água de poço colhidas antes da época chuvosa, e 54% das 13 amostras colhidas depois das chuvas, sendo esta diferença significativa ($p=0,0166$), como se pode ver nas figuras 2-*i*) e 3-*iii*). Nas águas de rede, MAP teve uma positividade de 32%, correspondendo a 6 das 19 amostras totais [figura 2-*ii*)]. Os biofilmes obtidos a partir de água de rede tiveram 9 amostras num total de 19 (47%) positivas para MAP, e os biofilmes de poços 56% (10 em 18 amostras), como se vê no gráfico *iv*) da figura 3. Relativamente às águas de poço [figura 2-*i*)], a frequência de biofilmes positivos para MAP foi significativamente superior à frequência de amostras de água positivas, no mesmo tempo de colheita ($p=0,0116$).

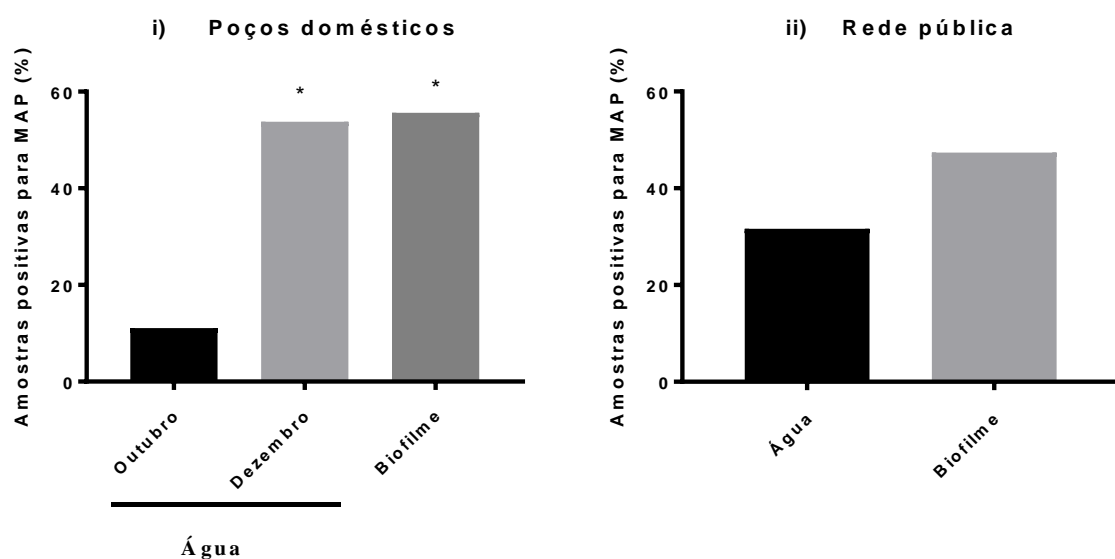


Figura 2: Percentagens de deteção de MAP nas várias amostras. **i)** resultados obtidos para as águas de poço antes e depois da época chuvosa (respetivamente, outubro e dezembro) e os biofilmes dos poços, $*p=0,0166$ (outubro vs. dezembro) e $*p= 0,0116$ (outubro vs. biofilme); **ii)** positividade para as águas de rede e respetivos biofilmes.

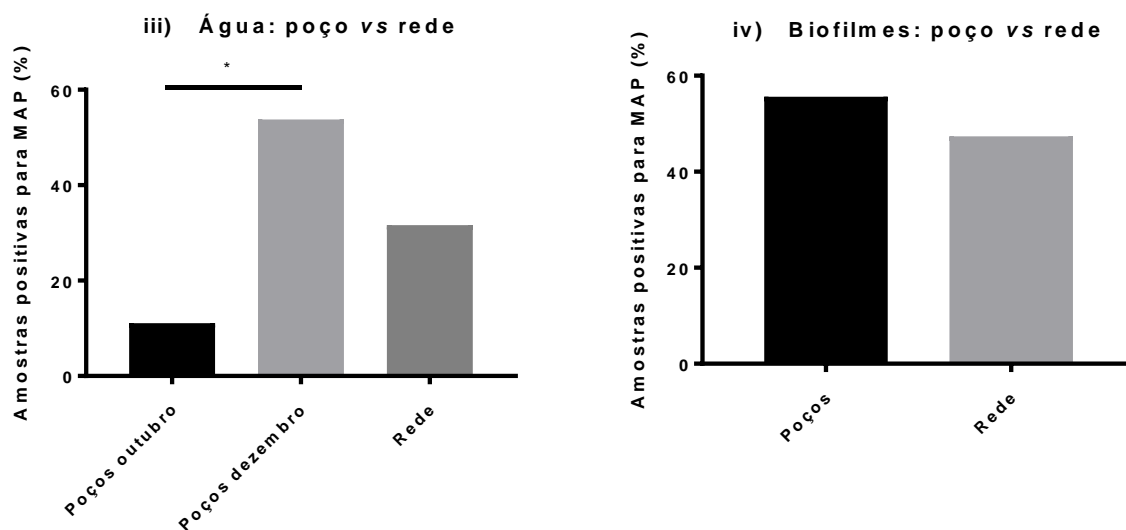


Figura 3: Comparação dos resultados obtidos na figura 2. **iii)** comparação da percentagem de positivos entre as águas de poço e as águas de rede, $*p=0,0166$; **iv)** comparação da percentagem de MAP obtida entre biofilmes de poços e de rede.

As figuras 4 a 7 representam a distribuição geográfica dos resultados da deteção de MAP. Da amostragem realizada não é possível verificar zonas de maior prevalência, havendo uma distribuição homogénea das amostras positivas, em todos os tipos de amostras, ou seja, biofilmes, águas de rede e águas poço em ambas as colheitas.

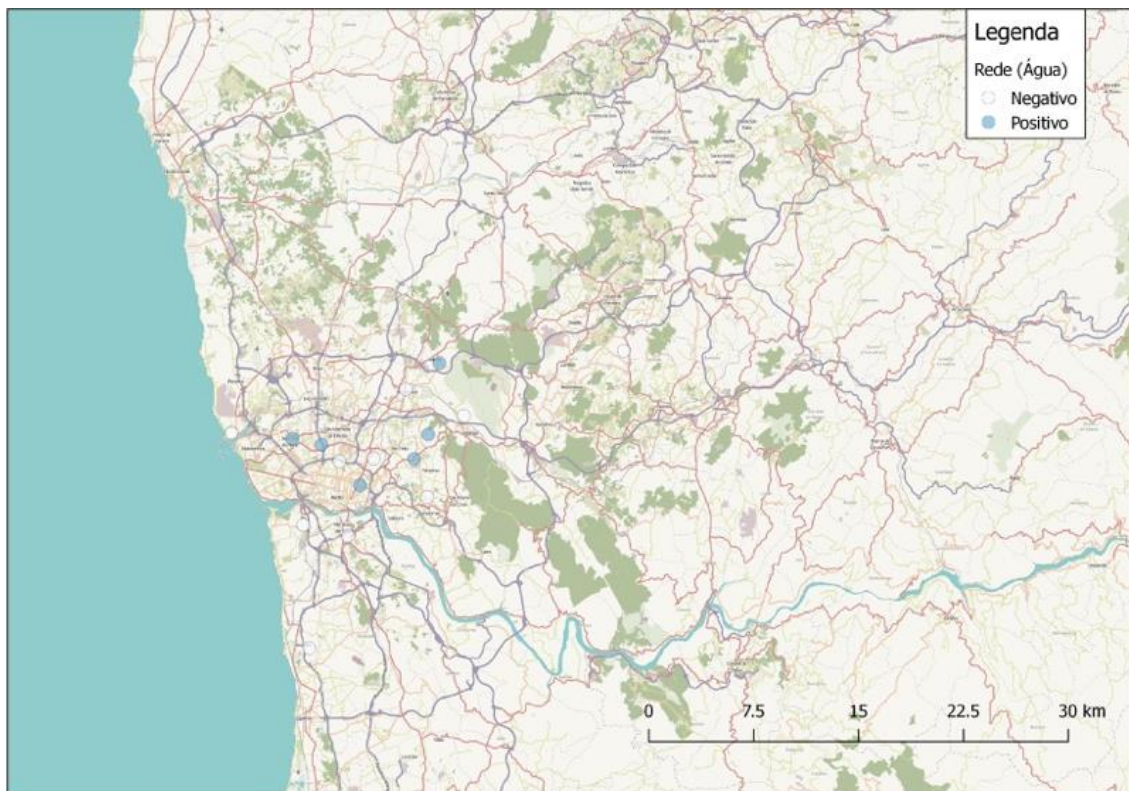


Figura 4: Resultados da distribuição geográfica de MAP nas águas de rede. A cor branca corresponde a uma morada com resultado negativo para MAP e a cor azul a um positivo.

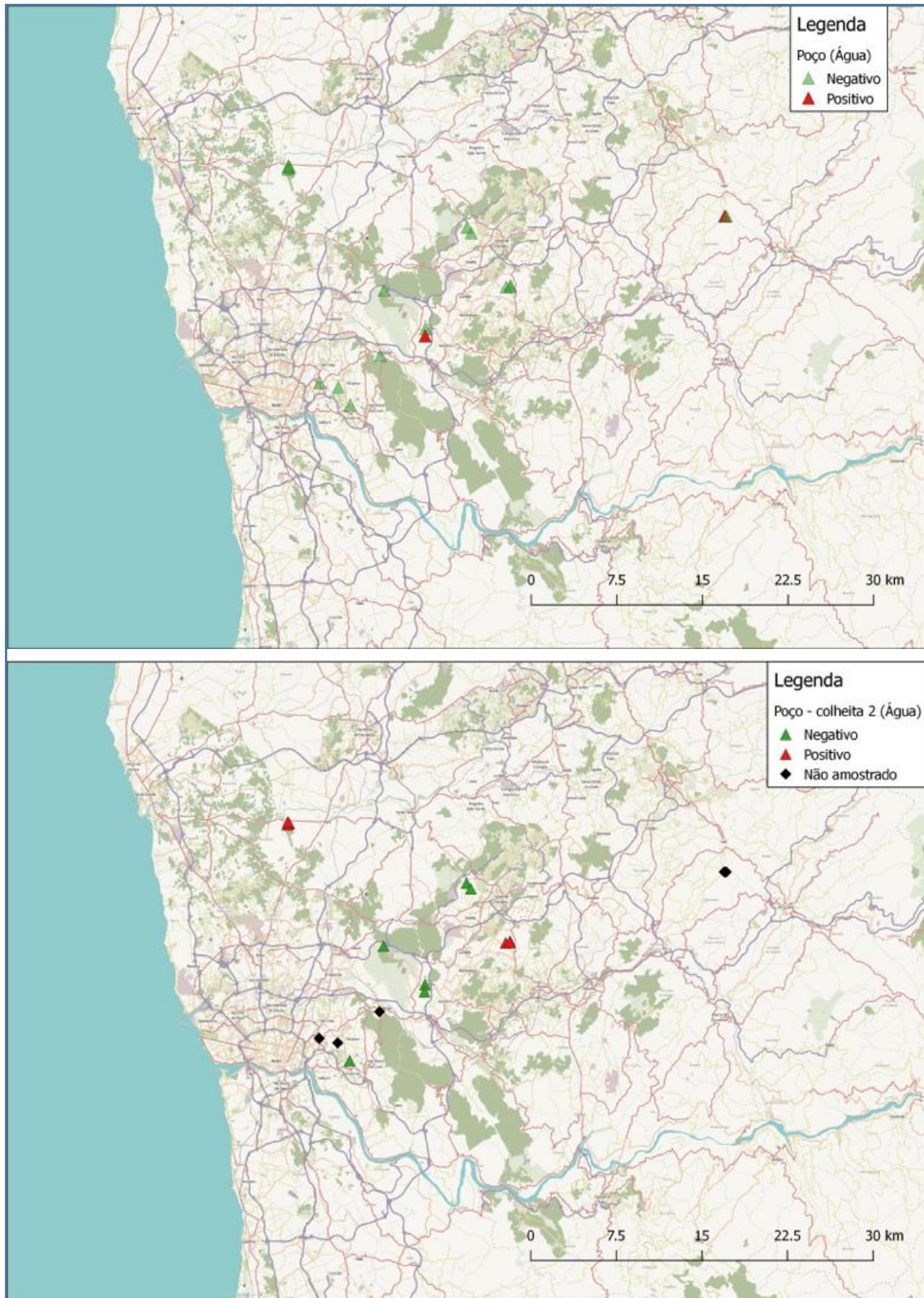


Figura 5: Resultados da deteção de MAP nas colheitas 1 e 2 das águas de poço. A cor verde corresponde a um resultado negativo para MAP; a cor vermelha a um positivo; a preto estão assinaladas as moradas que não fizeram parte da colheita 2.

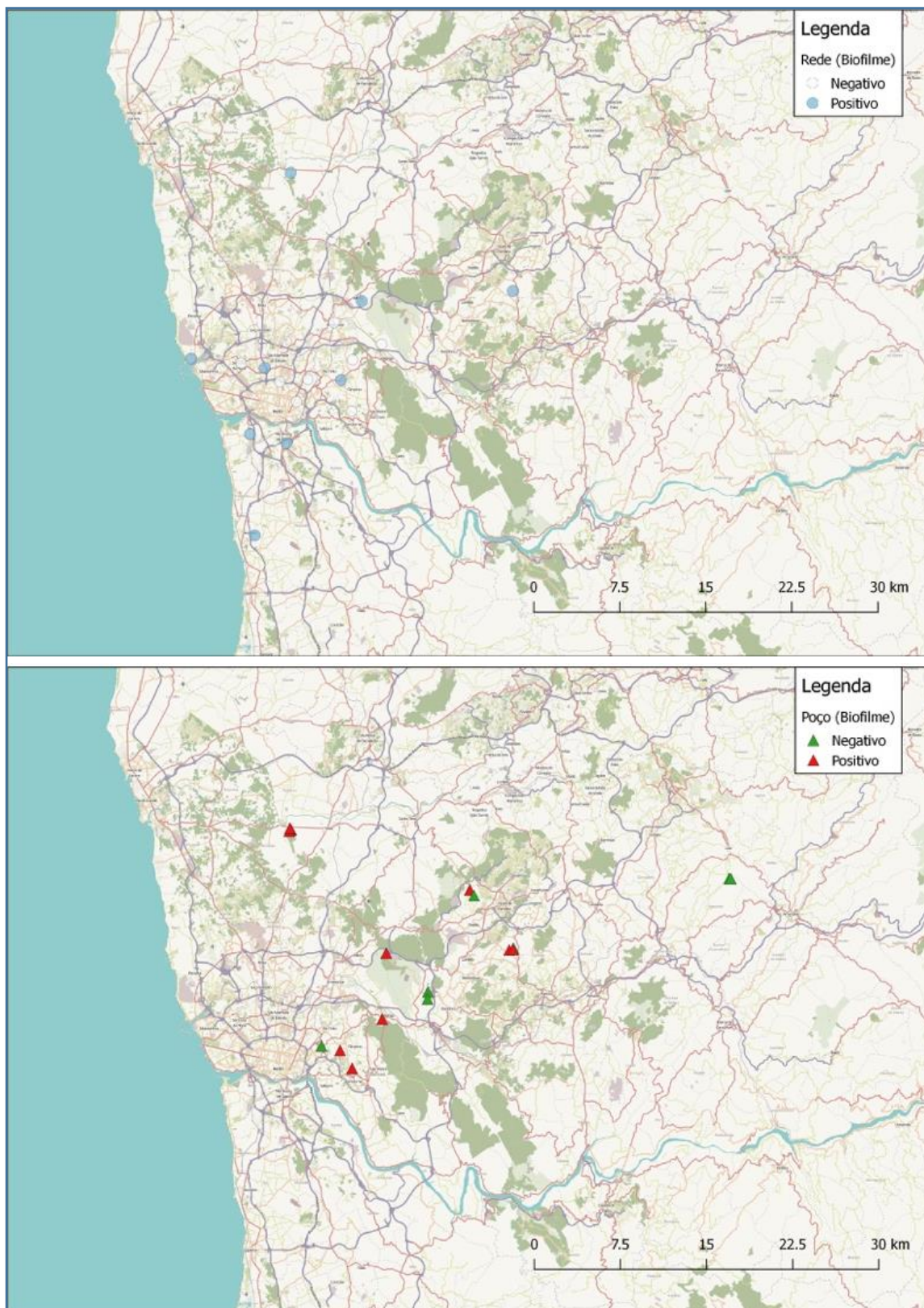


Figura 6: Distribuição geográfica dos resultados dos biofilmes. No mapa dos biofilmes de rede, a cor branca corresponde a um resultado negativo para MAP e a cor azul a um positivo. No mapa dos resultados de biofilmes de poço, a cor verde corresponde a uma morada com resultado negativo e a vermelha a um resultado positivo.

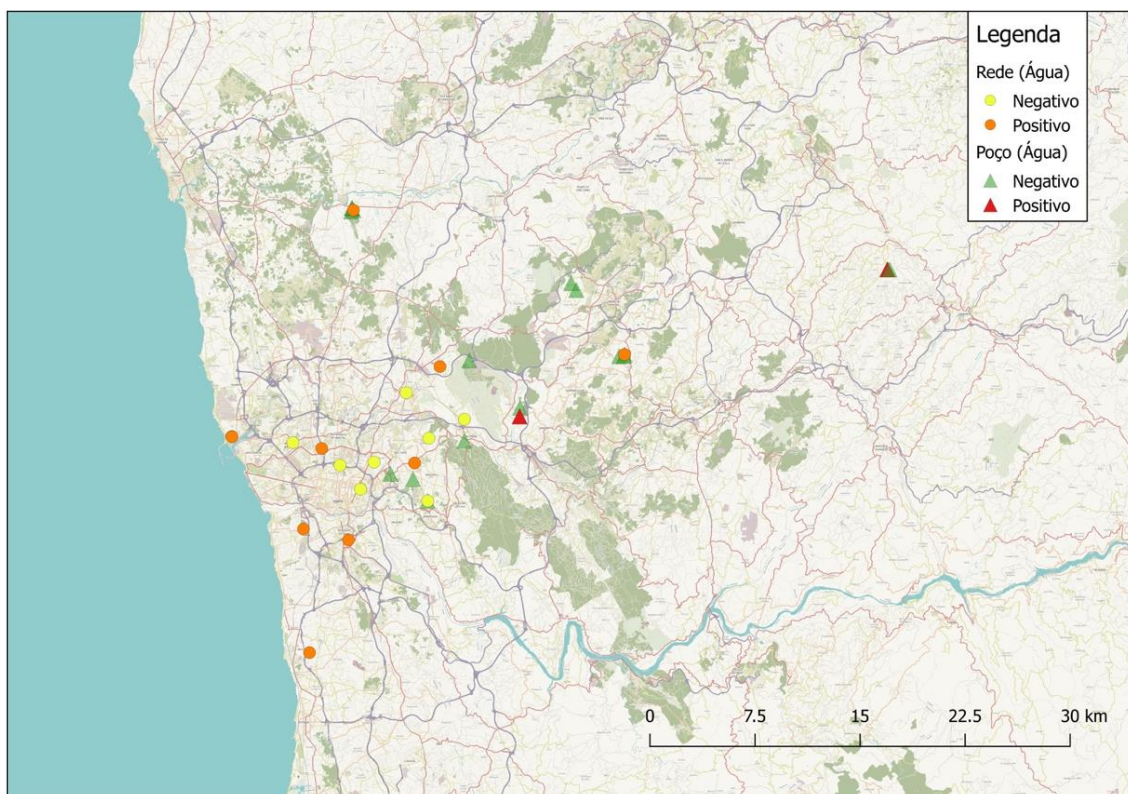


Figura 7: Comparação dos resultados referentes à totalidade de amostras de água - águas de rede e águas de poço (colheitas 1 e 2). Para a água de rede, a cor amarela corresponde a amostras negativas para a deteção de MAP e a cor laranja a amostras positivas. Para a água de poço, a cor verde significa uma amostra negativa para MAP e a cor vermelha a uma positiva.

3. Discussão de Resultados

A colheita 2 de amostras de águas de poços foi incluída no estudo para avaliar se a diluição como consequência do aumento da água disponível produziria uma diminuição na deteção de MAP. Na verdade, obteve-se o resultado inverso, ou seja, ocorreu um aumento significativo da deteção de MAP nas amostras de água de poço durante a época chuvosa. Este resultado poderá ser explicado por processos de lixiviação que ocorrem naturalmente com a chuva, o que levará a que a micobactéria, possivelmente presente no solo devido a contaminação com excrementos de animais (particularmente em zonas de criação de gado) atinja águas subterrâneas. A pesquisa de fatores geográficos de risco

ambiental, como a identificação de zonas de criação de gado e/ou endémicas de paratuberculose, seria importante para elucidação dos resultados obtidos. No entanto, não foram encontrados estudos sobre a prevalência e distribuição de paratuberculose no distrito do Porto, nomeadamente em concelhos da Área Metropolitana do Porto, embora existam estudos epidemiológicos deste tipo em Portugal.

Em concelhos da Área Metropolitana de Lisboa, dos rebanhos estudados, que incluíam ovinos e caprinos, 27% eram seropositivos para MAP (Mendes *et al.*, 2004). Na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, dos rebanhos estudados, 46,7% tinham pelo menos um animal seropositivo (Coelho *et al.*, 2007). Nessa mesma região, num outro estudo, foi detetado DNA de MAP em 18,7% da amostragem de ovinos (Coelho *et al.*, 2008). Tudo isto faz com que não seja surpreendente o aumento da percentagem de amostras de água de poço positivas com a estação das chuvas, o que de facto poderá estar relacionado com a contaminação dos solos por MAP.

Novos dados epidemiológicos deste tipo, apontando regiões com elevada prevalência de paratuberculose, podem ser importantes para futuras avaliações da presença de MAP no solo e água dessas regiões, e sua relação com prevalência de IBD.

Neste estudo não foi realizada uma segunda colheita de água de rede pública após a época de chuva. No entanto, dada a diferença significativa encontrada entre a percentagem de positividade para MAP em água de poço antes e depois da época chuvosa, e tendo em conta o facto de que, ao longo do ano, variam as zonas de captação de água para a obtenção de água potável, e sendo MAP resistente aos processos de desinfecção, faria também sentido a colheita de água de rede após a época chuvosa, algo que poderá ser feito em futuros estudos ambientais.

Os resultados obtidos para as amostras de água potável (32% de positividade), são concordantes com os estudos anteriores da literatura mencionados, considerando a média entre os vários valores referidos para água potável - de 3,3%, 13%, e 88% - com uma média de 35% (Beumer *et al.*, 2010; King *et al.*, 2016; Pistone *et al.*, 2012).

É de esperar uma maior deteção de MAP em biofilmes da tubagem face às amostras de água, já que, como relatado anteriormente, MAP é um importante colonizador de superfícies, tendo uma aderência muito forte. Pelo mesmo motivo, também foi obtida uma maior frequência de amostras positivas para MAP em biofilmes da rede pública do que na respetiva água, e é de notar que os sistemas de água potável da rede pública

possuem uma extensão considerável de tubagens, e, como tal, uma grande probabilidade de existência de biofilmes ao longo de toda a extensão.

Ainda no que diz respeito aos biofilmes, os dados encontrados na pesquisa literária incluem as percentagens para comparação de 76% e 11,8%, como descrito anteriormente (Beumer *et al.*, 2010; Chern *et al.*, 2015), que são valores bastante diferentes. A percentagem de biofilmes positivos para MAP neste estudo foi de 47%, para a rede pública, e de 56% para os poços. Tratam-se de percentagens intermédias entre estes valores encontrados na literatura e correspondem a valores de positividade consideráveis, já que cerca de metade das amostras recolhidas são positivas para MAP, quer na rede, quer em poços, não havendo grandes diferenças entre os dois.

A água de poço corresponde normalmente a água subterrânea. Das amostras de água de poço recolhidas, segundo o que nos foi transmitido pelos participantes, algumas eram usadas apenas para finalidades de rega e tarefas domésticas, enquanto outras eram águas testadas e que os residentes bebiam normalmente. Na literatura, além de um artigo que referiu ausência de deteção de MAP em águas de poço (Falkinham *et al.*, 2001), não foram encontrados dados acerca da deteção de MAP em águas subterrâneas (ou águas de poço) que possam ser usadas para comparação, mas apenas de águas de rio e águas superficiais. No entanto, tendo em conta que os poços analisados realmente englobaram água potável e não potável, e que a percentagem média de positividade de MAP na literatura, precisamente para água potável e não potável, é de **23%**, como referido anteriormente, então temos que a percentagem de amostras de água de poço (sem englobar biofilmes) positivas neste estudo - 9 amostras positivas num total de 31 amostras de poços analisados, correspondendo a uma frequência de **29%** - pode ser considerada idêntica à descrita na literatura.

Apesar dos resultados encontrados, este estudo apresenta algumas limitações.

Em primeiro lugar, é provável que o número de amostras colhido (**n**) seja ainda baixo para se encontrarem outras diferenças estatisticamente significativas. Seria importante aumentar o valor de **n** porque por um lado, a distribuição geográfica de resultados obtidos, para qualquer tipo de amostra (água de rede, poço e biofilmes) pode considerar-se homogénea, sem que se verifiquem zonas de maior concentração de amostras positivas para MAP. No entanto, é possível que o aumento do **n** venha a evidenciar áreas de maior contaminação por MAP, levando a resultados mais conclusivos quanto a *clusters*

geográficos de presença de MAP. Além disso, o aumento do **n** muito provavelmente aumentará a significância estatística dos resultados.

Em segundo lugar, embora tenha sido realizado um questionário sobre existência de IBD nos habitantes das casas de onde foram colhidas as amostras, apenas 2 casos foram reportados. Assim sendo, não é possível, neste estudo, relacionar a positividade de MAP com presença de IBD nas áreas pesquisadas. No entanto, tendo em conta todas as evidências da participação de MAP na etiologia da IBD apresentadas ao longo do trabalho, além da sua capacidade de persistir no ambiente (águas superficiais, água potável, solo), será interessante, em trabalho futuro e após devida autorização pela Comissão de Ética, cruzar dados das residências dos doentes IBD seguidos nos hospitais centrais do Porto com os nossos dados referentes à contaminação das águas, o que poderá permitir identificar associação entre contaminação ambiental por MAP e número de casos de IBD.

Vários *clusters* de IBD noutras zonas do globo têm vindo a ser relacionados com o consumo de água de proveniências específicas. Um estudo no estado de Virgínia avaliou a incidência de IBD em crianças que viviam em casas próximas de zonas de criação de animais - bovinos, caprinos, entre outros - ou então próximas de um lago que recebe água vinda dessas mesmas quintas de criação. Os resultados revelaram um *cluster* de infeção correspondente a uma incidência 47 vezes superior à média geral de IBD nos países industrializados (Pierce *et al.*, 2011). Numa aldeia em França, detetou-se um *cluster* de IBD em casas próximas entre si. Mais tarde, esse *cluster* foi associado ao consumo doméstico de água de um poço específico (entre os dois existentes na aldeia) muito próximo das casas onde existia doença (Kruiningen *et al.*, 2007). MAP poderá ser o agente presente nestes casos relatados com capacidade de contaminar as zonas de captação de água usadas para obter água potável e aumentar a incidência de IBD.

III. Conclusões

Apesar das limitações enumeradas, pode-se concluir que o objetivo principal proposto para este trabalho foi conseguido, já que foi possível uma avaliação da contaminação da água da Área Metropolitana do Porto por MAP, tendo-se obtido resultados credíveis comparando com a literatura.

MAP é uma bactéria com impacto na saúde pública e na economia. Os resultados obtidos reforçam a ideia de que o ambiente, concretamente o ambiente aquático, será uma reserva importante de MAP em Portugal, o que está em concordância com diferentes estudos prévios noutras áreas do globo. Futuros estudos utilizando cruzamento de dados de moradas de pacientes IBD e informação sobre contaminação ambiental nessas áreas serão necessários de forma a ser possível entender melhor a relação entre esta micobactéria e o desenvolvimento de IBD.

A IBD será uma síndrome complexa, resultante de numerosos fatores genéticos, epigenéticos, fisiológicos, imunológicos e ambientais contributivos – e MAP será um fator ambiental relevante para o seu desenvolvimento.

IV. Referências

Aboagye, G. and Rowe, M. T. (2011). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res*, 45, pp. 3271-8.

Aboagye, G. and Rowe, M. T. (2018). Optimisation of decontamination method and influence of culture media on the recovery of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from spiked water sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 150, pp. 24-28.

Ananthakrishnan, A. N. (2013). Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, 15, p. 302.

Ananthakrishnan, A. N.; Bernstein, C. N.; Iliopoulos, D., *et al.* (2017). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. pp.

APDI. (2012). *Associação Portuguesa da Doença Inflamatória do Intestino* [Em linha]. Disponível em: <http://www.apdi.org.pt> [Consultado em: 06/02/2018].

Azevedo, L. F.; Magro, F.; Portela, F., *et al.* (2010). Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 19, pp. 499-510.

Bastida, G. and Beltran, B. (2011). Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers. *World Journal of Gastroenterology*, 17, pp. 2740-7.

Becker, C.; Neurath, M. F. and Wirtz, S. (2015). The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal*, 56, pp. 192-204.

Behr, M. A. and Kapur, V. (2008). The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Current Opinion on Gastroenterology*, 24, pp. 17-21.

Bernstein, C. N. (2017). Review article: changes in the epidemiology of inflammatory bowel disease-clues for aetiology. *Alimentary Pharmacology & Therapy*, 46, pp. 911-919.

Beumer, A.; King, D.; Donohue, M., *et al.* (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp. 7367-70.

Bharathy, S.; Gunaseelan, L. and Porteen, K. (2017). Exploring the potential hazard of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause for Crohn's disease. *Vet World*, 10, pp. 457-460.

Bitti, M. L.; Masala S Fau - Capasso, F.; Capasso F Fau - Rapini, N., *et al.* (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in an Italian cohort of type 1 diabetes pediatric patients. p.1155.

Bull, T. J.; Munshi, T.; Mikkelsen, H., *et al.* (2017). Improved Culture Medium (TiKa) for *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* (MAP) Matches qPCR Sensitivity and Reveals Significant Proportions of Non-viable MAP in Lymphoid Tissue of Vaccinated MAP Challenged Animals. *Front Microbiol*, 7, p. 2112.

Card, T.; Logan, R. F.; Rodrigues, L. C., *et al.* (2004). Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*, 53, pp. 246-50.

Chern, E. C.; King, D.; Haugland, R., *et al.* (2015). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction assays targeting *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. avium* subspecies *paratuberculosis* in drinking water biofilms. pp.131-8.

Coelho, A. C.; Pinto, M. L.; Coelho, A. M., *et al.* (2008). Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Ruminant Research*, 76, pp. 201-206.

Coelho, A. C.; Pinto, M. L.; Silva, S., *et al.* (2007). Seroprevalence of ovine *paratuberculosis* infection in the Northeast of Portugal. *Small Ruminant Research*, 71, pp. 298-303.

Crohn's and Colitis Foundation. (2018). *Crohn's & Colitis Foundation* [Em linha]. Disponível em: <http://www.crohnscolitisfoundation.org> [Consultado em: 06/02/2018]].

Dalal, S. R. and Chang, E. B. (2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *The Journal of Clin Investigation*, 124, pp. 4190-6.

Dow, C. T. (2012). *M. paratuberculosis* Heat Shock Protein 65 and Human Diseases: Bridging Infection and Autoimmunity. pp.824-9.

Elguezabal, N.; Chamorro, S.; Molina, E., *et al.* (2012). Lactase persistence, NOD2 status and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection associations to Inflammatory Bowel Disease. *Gut Pathogens*, 4, p. 6.

Espeschit, I. F.; Souza, M. C. C.; Lima, M. C., *et al.* (2018). First molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* identified in animal and human drinking water from dairy goat farms in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, pp. 358-361.

Falkinham, J. O. (2018). *Mycobacterium avium* complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiology*, 4, pp. 428-438.

Falkinham, J. O., 3rd (2007). Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp.250-254.

Falkinham, J. O., 3rd (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*, 107, pp. 356-67.

Falkinham, J. O., 3rd; Norton, C. D. and Lechevallier, M. W. (2001). Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 1225-31.

Felder, J. B.; Korelitz, B. I.; Rajapakse, R., *et al.* (2000). Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *The American Journal of Gastroenterology*, 95, pp. 1949-54.

Feldman, P. A.; Wolfson, D. and Barkin, J. S. (2007). Medical management of Crohn's disease. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 20, pp. 269-81.

Ferwerda, G.; Kullberg, B. J.; De Jong, D. J., *et al.* (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *Journal of Leukocyte Biology*, 82, pp. 1011-8.

Friswell, M.; Campbell, B. and Rhodes, J. (2010). The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver*, 4, pp. 295-306.

Garvey, M. (2018). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open veterinary journal*, 8, pp. 172-181.

Gilat, T.; Hacoheh, D.; Lilos, P., *et al.* (1987). Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22, pp. 1009-24.

Girardelli, M.; Basaldella, F.; Paolera, S. D., *et al.* (2018). Genetic profile of patients with early onset inflammatory bowel disease. *Gene*, 645, pp. 18-29.

Guirado, E.; Arcos, J.; Knaup, R., *et al.* (2012). Characterization of clinical and environmental *Mycobacterium avium* spp. isolates and their interaction with human macrophages. *Plos one*, 7, pp. 45411.

Hansen, R.; Thomson, J. M.; El-Omar, E. M., *et al.* (2010). The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 45, pp. 266-76.

Head, K. and Jurenka, J. S. (2004). Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative Medicine Review*, 9, pp. 360-401.

Head, K. A. and Jurenka, J. S. (2003). Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative Medicine Review*, 8, pp. 247-83.

Hilborn, E. D.; Covert, T. C.; Yakrus, M. A., *et al.* (2006). Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp. 5864-9.

Hospital Lusíadas (2014).[Em linha]. Disponível em: <http://www.lusíadas.pt> [Consultado em: 18/03/2018].

Johnson, C.; Wannemuehler, M. and Hostetter, J. (2014). *Mycobacterium avium* paratuberculosis infection augments innate immune responses following intestinal epithelial injury. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 239, pp. 436-41.

Johnson, M. M. and Odell, J. A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, 6, pp. 210-20.

Juste, R. A.; Elguezal, N.; Garrido, J. M., *et al.* (2008). On the prevalence of *M. avium* subspecies paratuberculosis DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Plos One*, 3, pp. e2537.

Kehrmann, J.; Schoerding, A.K.; Murali, R., *et al.* (2016). Performance of Vitek MS in identifying nontuberculous mycobacteria from MGIT liquid medium and Lowenstein–Jensen solid medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84, pp. 43-47.

King, D. N.; Donohue, M. J.; Vesper, S. J., *et al.* (2016). Microbial pathogens in source and treated waters from drinking water treatment plants in the United States and implications for human health. *Science of the Total Environment*, 562, pp. 987-995.

Kirkwood, C. D.; Wagner, J.; Boniface, K., *et al.* (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, pp. 1643-55.

Klanicova, B.; Slana, I.; Roubal, P., *et al.* (2012). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 157, pp. 150-155.

Kmiec, Z.; Cyman, M. and Slebioda, T. J. (2017). Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in Medical Sciences*, 62, pp. 1-16.

Kruiningen, H. J. V.; Joossens, M. and Colombel, J.F. (2007). Cluster of Crohn's disease in Hery, France, including 2 cases from a common residence. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13, pp. 1454-1455.

Kuballa, P.; Huett, A.; Rioux, J. D., *et al.* (2008). Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *Plos One*, 3, p. 3391.

Kuenstner, J. T.; Naser, S.; Chamberlin, W., *et al.* (2017). The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. p.208.

Lapaquette, P.; Brest, P.; Hofman, P., *et al.* (2012). Etiology of Crohn's disease: many roads lead to autophagy. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, 90, pp. 987-96.

Lewis, J. D. (2016). The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology and Hepatology (NY)*, 12, pp. 51-3.

Li, J. and Glover, S. C. (2018). Innate Lymphoid Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*, pp.1-7.

Mann, E. A. and Saeed, S. A. (2012). Gastrointestinal infection as a trigger for inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 28, pp. 24-9.

Martini, E.; Krug, S. M.; Siegmund, B., *et al.* (2017). Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 4, pp. 33-46.

Mehta, M.; Ahmed, S. and Dryden, G. (2017). Immunopathophysiology of inflammatory bowel disease: how genetics link barrier dysfunction and innate immunity to inflammation. *Innate Immun*, 23, pp. 497-505.

Mendes, S.; Boinas, F.; Albuquerque, T., *et al.* (2004). Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. *Épidémiologie et Santé Animale*, 45, pp.61-71.

Miller, F. W. (2011). Environmental agents and autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 711, pp. 61-81.

Morris, D. L.; Montgomery, S. M.; Galloway, M. L., *et al.* (2001). Inflammatory bowel disease and laterality: is left handedness a risk? *Gut*, 49, pp. 199-202.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2013). *Medical Microbiology*. Philadelphia. Elsevier Saunders, 7^a Ed., pp.235-42.

Deteção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* no ambiente: estudo na Área Metropolitana do Porto

Naser, S. A.; Ghobrial, G.; Romero, C., *et al.* (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet*, 364, pp. 1039-44.

Nazareth, N.; Magro, F.; Machado, E., *et al.* (2015). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Escherichia coli* in blood samples from patients with inflammatory bowel disease. *Medical Microbiology and Immunology*, 204, pp. 681-92.

Nitzan, O.; Elias, M.; Peretz, A., *et al.* (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22, pp. 1078-87.

Norton, C.; Czuber-Dochan, W.; Artom, M., *et al.* (2017). Systematic review: interventions for abdominal pain management in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46, pp. 115-125.

Oken, H. A.; Saleeb, P. G.; Redfield, R. R., *et al.* (2017). Is *Mycobacterium avium paratuberculosis* the Trigger in the Crohn's Disease Spectrum? *Open Forum Infectious Diseases*, 4, p. 104.

Olsen, I.; Tollefsen, S.; Aagaard, C., *et al.* (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *Plos One*, 4, p. 5641.

Packey, C. D. and Sartor, R. B. (2009). Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Current Opinion on Infectious Diseases*, 22, pp. 292-301.

Pastorelli, L.; Salvo, C.D.; mercado, J.R. *et al.* (2013). Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1-22.

Patel, A. and Shah, N. (2011). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*--incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44, pp. 473-9.

Persson, P. G. and Ahlbom, A. (1988). Relative risk is a relevant measure of association of left-handedness with inflammatory bowel disease. *Neuropsychologia*, 26, pp. 737-40.

Pickup, R. W.; Rhodes, G.; Arnott, S., *et al.* (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp. 2130-9.

Pickup, R. W.; Rhodes, G.; Bull, T. J., *et al.* (2006). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp. 4067-77.

Pierce, E. S. (2010). Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain?. *Gut Pathogens*, 2, pp. 1-11.

Pierce, E. S. (2018). Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis...and colorectal cancer? *Infectious Agents and Cancer*, 13, pp. 1-6.

Pierce, E. S.; Borowitz, S. M. and Naser, S. A. (2011). The Broad Street pump revisited: dairy farms and an ongoing outbreak of inflammatory bowel disease in Forest, Virginia. *Gut pathogens*, 3, pp. 1-5.

Pistone, D.; Marone, P.; Pajoro, M., *et al.* (2012). *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Italy: commensal or emerging human pathogen? *Digestive and Liver Disease*, 44, pp. 461-5.

Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 347, pp. 417-29.

Qin, X. (2012). Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World Journal of Gastroenterology*, 18, pp. 1708-22.

Rang, H. P.; Dale., M.M.; Ritter, J.M. *et al.* (2012). *Rang & Dale Farmacologia*. São Paulo, Elsevier, 7ª Ed., pp. 330-633.

Rosenfeld, G. and Bressler, B. (2010). *Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 24, pp. 619-24.

Salem, M.; Ammitzboell, M.; Nys, K., *et al.* (2015). ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*, 11, pp. 585-94.

Samba-Louaka, A.; Robino, E.; Cochard, T., *et al.* (2018). Environmental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Hosted by Free-Living Amoebae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 28, pp. 1-8.

Savi, R.; Ricchi, M.; Cammi, G., *et al.* (2015). Survey on the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ground beef from an industrial meat plant. *Vet Microbiology*, 177, pp. 403-8.

Shivashankar, R. and Lewis, J. D. (2017). The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Current Gastroenterology Reports*, 19, p. 22.

Singh, A. V.; Singh, S.; Singh, P., *et al.* (2010). Is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the cause of Johne's disease in animals, a good candidate for Crohn's disease in man? , *Indian Journal of Gastroenterology*, 19, pp.53-8.

Singh, U. P.; Singh S Fau - Singh, R.; Singh R Fau - Karls, R. K., *et al.* (2007). Influence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on colitis development and specific immune responses during disease. *Infeccion and Immunity*, 75, pp. 3722-8.

SPED. (2017). *Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva* [Em linha]. Disponível em: <http://www.sped.pt> [Consultado em: 23/03/2018].

Steed, K. A. and Falkinham, J. O., 3rd (2006). Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp. 4007-11.

Waddell, L.; Rajic, A.; Stark, K., *et al.* (2016). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Preventive Veterinary Medicine*, 132, pp. 32-48.

Wang, M. H.; Fiocchi, C.; Zhu, X., *et al.* (2014). Gene-gene and gene-environment interactions in ulcerative colitis. *Human Genetics*, 133, pp. 547-58.

Whan, L.; Ball, H. J.; Grant, I. R., *et al.* (2005). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp. 7107-12.

Whan, L.; Grant, I. R. and Rowe, M. T. (2006). Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiology*, 6, pp. 63-68.

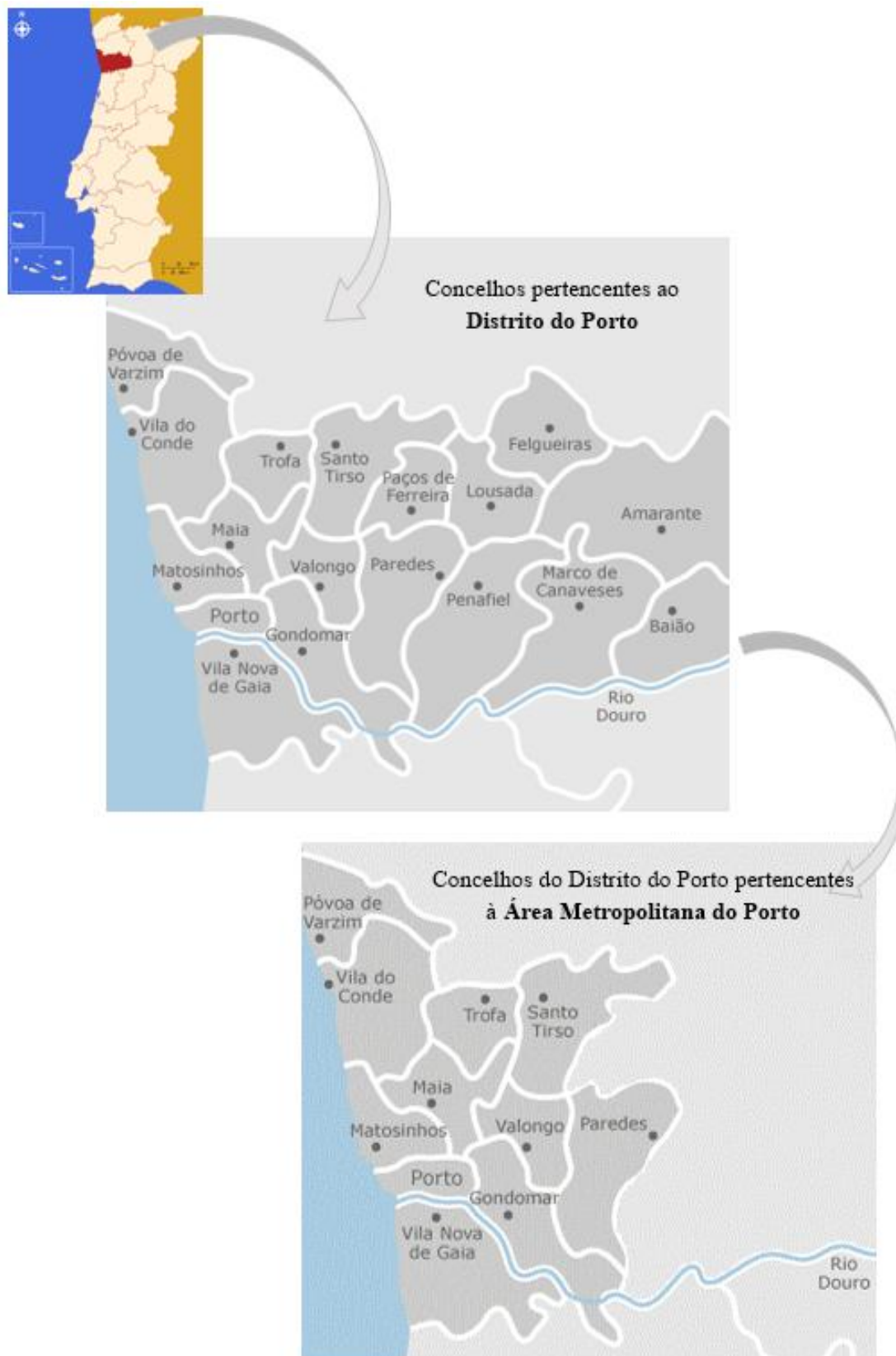
Wu, G. D.; Bushmanc, F. D. and Lewis, J. D. (2013). Diet, the human gut microbiota, and IBD. *Anaerobe*, 24, pp. 117-20.

Wurzelmann, J. I.; Lyles, C. M. and Sandler, R. S. (1994). Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 39, pp. 555-60.

Zhang, H.; Massey, D.; Tremelling, M., *et al.* (2008). Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *British Medical Bulletin*, 87, pp. 17-30.

V. ANEXOS

1. Anexo 1: Mapa da área em estudo: Concelhos do Distrito do Porto pertencentes à Área Metropolitana do Porto.



2. Anexo 2: Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de água.

DNeasy[®] PowerWater[®] Kit Handbook



Protocol: [DNeasy PowerWater Kit Handbook](#)

Important points before starting

- Solution PW1 must be warmed at 55°C for 5–10 minutes to dissolve precipitates prior to use. Solution PW1 should be used while still warm.
- If Solution PW3 has precipitated, heat at 55°C for 5–10 minutes to dissolve precipitate.
- Shake to mix Solution PW4 before use.

Procedure

1. Filter water samples using a filter funnel attached to a vacuum source. The volume of water filtered will depend on the microbial load and turbidity of the water sample.
Note: Please see Appendix A: Types of water samples.
2. If using a reusable filter funnel, remove the upper portion of the apparatus.
3. Using two sets of sterile forceps, pick up the white filter membrane at opposite edges and roll the filter into a cylinder with the top side facing inward.
Note: Do not tightly roll or fold the filter membrane. To see a video, please visit the DNeasy PowerWater Kit product page at <https://mobio.com/powerwater-filter>.
4. Insert the filter into a 5 ml PowerWater DNA Bead Tube.
5. Add 1 ml of Solution PW1 to the PowerWater DNA Bead Tube.
Note: For samples containing organisms that are difficult to lyse (e.g. fungi, algae) an additional heating step can be included. See Alternative Lysis Methods in the Troubleshooting Guide.
6. Secure the tube horizontally to a Vortex Adapter (cat. no. 13000-V1-5/13000-V1-15).
7. Vortex at maximum speed for 5 min. Centrifuge the tubes $\leq 4000 \times g$ for 1 min at room temperature. (This centrifugation step is optional if a centrifuge with a 15 ml tube rotor is not available, but will result in minor loss of supernatant).
8. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided). Draw up the supernatant using a 1 ml pipette tip by placing it down into the beads.

Note: Placing the pipette tip down into the beads is required. Pipette until you have removed all the supernatant. Expect to recover 600–650 μ l of supernatant.

9. Centrifuge at 13,000 \times g for 1 min at room temperature.
10. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200 μ l of Solution IRS and vortex briefly to mix. Incubate at 2–8°C for 5 min.
12. Centrifuge the tubes at 13,000 \times g for 1 min.
13. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Add 650 μ l of Solution PW3 and vortex briefly to mix.
15. Load 650 μ l of supernatant onto an MB Spin Column. Centrifuge at 13,000 \times g for 1 min. Discard the flow-through. Repeat until all the supernatant has been processed.
16. Place the MB Spin Column Filter into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
17. Add 650 μ l of Solution PW4 (shake before use). Centrifuge at 13,000 \times g for 1 min.
18. Discard the flow-through and add 650 μ l of ethanol (provided) and centrifuge at 13,000 \times g for 1 min.
19. Discard the flow-through and centrifuge again at 13,000 \times g for 2 min.
20. Place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
21. Add 100 μ l of Solution EB to the center of the white filter membrane.
22. Centrifuge at 13,000 \times g for 1 min.
23. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

Note: We recommend storing DNA frozen (–20°C to –80°C) as Solution EB does not contain EDTA. To concentrate DNA, see the Troubleshooting Guide.

3. Anexo 3: Protocolo para extração de DNA a partir de amostras de biofilmes.

DNeasy® PowerBiofilm® Kit Handbook



— Sample to Insight —

Protocol:

Important points before starting

- Warm Solution MBL at 55°C for 5–10 min to dissolve precipitates prior to each use. Solution MBL should be used while still warm.
- If Solution MR has precipitated warm at 55°C for 5–10 minutes.
- Shake to mix Solution PW before use.
- Use only PowerBiofilm Bead Tubes with this kit.

Procedure

1. Weigh out 0.05–0.20 g of biofilm material and place into a 2 ml Collection Tube (provided). Centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Remove excess liquid using a pipette tip.
Note: Add less saturated samples (e.g., microbial mats) directly to the PowerBiofilm Bead Tube (For information on selecting the right amount of starting material, refer to the Troubleshooting Guide).
2. Resuspend the biofilm material in 350 µl of Solution MBL and transfer to the PowerBiofilm Bead Tube. For less saturated samples, add 350 µl of Solution MBL to the PowerBiofilm Bead Tube already containing the biofilm material.
3. Add 100 µl of Solution FB. Vortex briefly to mix.
4. Incubate the PowerBiofilm Bead Tube at 65°C for 5 min.
5. Bead beat the sample following one of the methods described below:
 - A. PowerLyzer 24 Homogenizer**
 1. Identify each PowerBiofilm Bead Tube on **both** the cap and on the side.
 2. Properly balance the Bead Tubes in the tube holder of the PowerLyzer 24 and homogenize for 1 cycle at 3200 rpm for 30 s.
 3. Centrifuge the tube at 13,000 x g for 1 min. Transfer the supernatant to a new 2 ml Collection Tube (provided).

Note: Expect approximately 325–400 μl of supernatant depending on sample material. If the volume falls below this range, use less starting material.

B. Vortex Adapter

1. Secure the PowerBiofilm Bead Tube horizontally to a Vortex Adapter and vortex at maximum speed for 10 min.

Note: If using the 24-place Vortex Adapter for ≥ 12 preps, increase time by 5–10 min.

2. Centrifuge the tube at 13,000 $\times g$ for 1 min at room temperature. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

Note: Expect approximately 400–450 μl of supernatant depending on sample material. If the volume falls below this range, use less starting material.

6. Add 100 μl of Solution IRS and vortex briefly to mix. Incubate at 2–8°C for 5 min.

Note: Use 200 μl of Solution IRS if the sample is known to contain excessive amounts of inhibitors or the supernatant is very darkly colored. Refer to the Troubleshooting Guide.

7. Centrifuge the tube at 13,000 $\times g$ for 1 min at room temperature.

8. Avoiding the pellet, transfer all of the supernatant to a 2 ml Collection Tube (provided).

Note: Expect approximately 375–450 μl in volume depending on sample material.

9. Add 900 μl of Solution MR and vortex briefly to mix.

10. Load 650 μl of supernatant onto a MB Spin Column and centrifuge at 13,000 $\times g$ for 1 min. Discard the flow-through and repeat until all the supernatant has been processed.

11. Place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided).

12. Add 650 μl of Solution PW and centrifuge at 13,000 $\times g$ for 1 min at room temperature.

13. Discard the flow-through and add 650 μl of ethanol (provided) and centrifuge at 13,000 $\times g$ for 1 min at room temperature.

14. Discard the flow-through and centrifuge again at 13,000 $\times g$ for 2 min.

15. Place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided).

16. Add 100 μl of Solution EB to the center of the white filter membrane.

17. Centrifuge at 13,000 $\times g$ for 1 min.

18. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

4. Anexo 4: Protocolo para execução do *Real-Time* PCR.

PROTOCOLO – LightCycler 1.1

DATA ___ / ___ / ___

Tubo	Amostra	cap	obs
0			
1			
2			
3			
4			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

Tubo	Amostra	Cap	Obs
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			

1º PCR

Irradiar 1ª Câmara de fluxo durante pelo menos 30-60min

Fazer a mix RT-PCR (n=Nº tubos *1.1 ou Nºtubos+1)				
<input type="checkbox"/> Na sala das "Master-Mix" preparar a mistura de reação: <input type="checkbox"/> H ₂ O n x 3 = _____ µl <input type="checkbox"/> Mix SSO n x 10 = _____ µl <input type="checkbox"/> Primer L1 (5 µM) n x 1 = _____ µl <input type="checkbox"/> Primer L2 (5 µM) n x 1 = _____ µl Total n x 15.0 = _____ µl <input type="checkbox"/> Distribuir 15 µl mix por capilar <input type="checkbox"/> Adicionar 5 µl H ₂ O ao capilar do cont.Neg. <u>Passar para a Câmara de fluxo</u> <input type="checkbox"/> Adicionar 5 µl de amostra aos restantes capilares <u>Passar para a Sala das Amplificações</u> <input type="checkbox"/> Centrifugar na centrífuga do LightCycler <input type="checkbox"/> Preparar no computador no LightCycler novo run com o programa MAP <input type="checkbox"/> 1 X [95°C-3'].....(Ativ. Enz) <input type="checkbox"/> 30 X [95°C-15"; 57°C-15"; 72°C-60"-Read].....(PCR) <input type="checkbox"/> 1 X [95°C-15"; 47°C-15"; 96°C-ramp=0.2°C/s;Read-contin.] <input type="checkbox"/> 1 X [30°C-30"].....(Cool) <input type="checkbox"/> Guardar capilares a 4°C.	n=5	n=10	n=33	Dados do Kit Lote: _____ Prazo Validade: _____ / _____ / _____
	<input type="checkbox"/> 15 µl	<input type="checkbox"/> 30 µl	<input type="checkbox"/> 99 µl	
	<input type="checkbox"/> 50 µl	<input type="checkbox"/> 100 µl	<input type="checkbox"/> 330 µl	
	<input type="checkbox"/> 5 µl	<input type="checkbox"/> 10 µl	<input type="checkbox"/> 33 µl	
	<input type="checkbox"/> 5 µl	<input type="checkbox"/> 10 µl	<input type="checkbox"/> 33 µl	
	<input type="checkbox"/> 75 µl	<input type="checkbox"/> 150 µl	<input type="checkbox"/> 495 µl	

Irradiar 1ª Câmara de fluxo durante pelo menos 30-60min

5. Anexo 5: Protocolo para execução do *Real-Time Nested PCR*.

Nested PCR

- Irradiar 2ª Câmara de fluxo durante pelo menos 30-60min
- Centrifugar capilares invertidos em *ependorfs* 1.5mL etiquetados

Fazer a mix RT-PCR (n=N° tubos *1.1 ou N°tubos+1)				Dados do Kit
	n=5	n=10	n=33	
<input type="checkbox"/> Na sala das "Master-Mix" preparar a mistura de reação: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> H₂O..... n x 3 = _____ µl <input type="checkbox"/> Mix SSO..... n x 10 = _____ µl <input type="checkbox"/> Primer AV1 (5 µM)..... n x 1 = _____ µl <input type="checkbox"/> Primer AV2 (5 µM)..... n x 1 = _____ µl Total..... n x 15.0 = _____ µl <input type="checkbox"/> Distribuir 15 µl mix por capilar <input type="checkbox"/> Adicionar 5 µl H ₂ O ao capilar do Nested cont.Neg. <p style="text-align: center;"><u>Passar para a 2ª Câmara de fluxo</u></p> <input type="checkbox"/> Adicionar 5 µl de amostra aos restantes capilares <p style="text-align: center;"><u>Passar para a Sala das Amplificações</u></p> <input type="checkbox"/> Centrifugar na centrifuga do LightCycler <input type="checkbox"/> Preparar no computador no LightCycler novo run com o programa MAP <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 1 X [95°C-3'].....Ativação Enzima <input type="checkbox"/> 30 X [95°C-30''; 57°C-30''; 72°C-90''-Read].PCR 	<input type="checkbox"/> 15 µl <input type="checkbox"/> 50 µl <input type="checkbox"/> 5 µl <input type="checkbox"/> 5 µl <input type="checkbox"/> 75 µl	<input type="checkbox"/> 30 µl <input type="checkbox"/> 100 µl <input type="checkbox"/> 10 µl <input type="checkbox"/> 10 µl <input type="checkbox"/> 150 µl	<input type="checkbox"/> 99 µl <input type="checkbox"/> 330 µl <input type="checkbox"/> 33 µl <input type="checkbox"/> 33 µl <input type="checkbox"/> 495 µl	<p style="text-align: center;">Dados do Kit</p> Lote: _____ Prazo Validade: _____/_____/_____

- Irradiar 2ª Câmara de fluxo durante pelo menos 30-60min