

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Desenvolvimento e validação de método de
amplificação isotérmica para detecção de
leptospiras patogênicas**

Violetta Dias Pacce

Pelotas, 2020

Violetta Dias Pacce

**Desenvolvimento e validação de método de amplificação isotérmica para
detecção de leptospiros patogênicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: biologia molecular).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Coorientador: Vagner Ricardo Lunge

Pelotas, 2020

Violetta Dias Pacce

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catálogo na Publicação

P114d Pacce, Violetta

Desenvolvimento e validação de método de amplificação isotérmica para detecção de leptospiros patogênicos / Violetta Pacce ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Vagner Ricardo Lunge, coorientador. — Pelotas, 2020.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Leptospira. 2. Diagnóstico. 3. Lamp. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Lunge, Vagner Ricardo, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Universidade Federal de Pelotas)

Dr. Sérgio Jorge (Universidade Federal de Pelotas)

Dra. Carolina Rodrigues Félix (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador, Universidade Federal de Pelotas)

Para a minha mãe, e todos os que defendem o ensino público gratuito e de
qualidade.

Dedico.

Agradecimentos

À minha mãe, pelo amor e apoio incondicional durante cada etapa da minha vida, e ao meu irmão por toda amizade e incentivo;

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todos os ensinamentos e educação de qualidade;

Ao meu orientador Odir Dellagostin, pela orientação, apoio, incentivo e por ser um exemplo de competência e profissionalismo. Tenho muito orgulho em ser tua orientada.

Ao meu coorientador Vagner, por todos os ensinamentos, pela ajuda, por me acompanhar durante toda a parte experimental no laboratório. Não tenho nem palavras, muito obrigada!

Ao pessoal do Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA, por toda a ajuda e disponibilidade em me inserir na rotina de vocês. E em especial à Margarida, por me ensinar e ajudar com o desenho dos *primers*.

Aos meus queridos amigos e colegas do Laboratório de Vacinologia, por todo apoio e ajuda de sempre, pelas risadas e companheirismo! Amanda, Mara, Michele, Natasha, Sérgio e Thaís, vocês são incríveis! Um agradecimento especial à Natashinha e à Belinha, por não medirem esforços em me ajudar quando preciso.

À minha amiga e fiel escudeira nesse processo, Laura Camargo, obrigada por me apoiar, dividir as felicidades e angústias, e vivenciar cada momento dessa vida “biotecnológica” comigo.

Às minhas amigas Emili, Laura, Luiza e Mariana's, por me entenderem e me apoiarem desde sempre!

Ao Gustavo, por todo apoio e carinho, e principalmente por acreditar em mim.

À CAPES, pela concessão da bolsa e demais agências de fomento pelo financiamento do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Muito obrigada!

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie

Resumo

PACCE, Violetta. **Desenvolvimento e validação de método de amplificação isotérmica para detecção de leptospiros patogênicos**. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* que afeta tanto humanos quanto animais. Devido à semelhança dos sinais clínicos com outras doenças febris, o diagnóstico torna-se um desafio. Os métodos de diagnóstico diretos e indiretos atualmente utilizados são a cultura bacteriana e os testes sorológicos, respectivamente. Esses, por sua vez, apresentam uma série de desvantagens como por exemplo, o tempo de realização e a detecção indireta da bactéria através de anticorpos. Nesse contexto, faz-se necessária a busca de novas alternativas para o diagnóstico da leptospirose. Embora existam testes moleculares, como o PCR, os quais são bastante eficientes e sensíveis, os mesmos necessitam de equipamentos sofisticados para sua realização, o que não torna seu uso viável em países subdesenvolvidos. O objetivo desse estudo foi desenvolver testes de amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) para três diferentes genes alvo (LIC13162, LIC20239 e *lipL32*) a fim de detectar leptospiros patogênicos. Construções de *primers* foram realizadas para as sequências, e testadas em diferentes tempos e concentrações de enzima. O desempenho analítico foi avaliado com base em curva de diluição de cultivo puro de *Leptospira*, com análise estatística PROBIT e DNA de diversas espécies bacterianas. A performance diagnóstica foi realizada com 63 amostras (44 negativas e 19 positivas) de tecido renal de hamsters. Ambas as análises tiveram seus resultados comparados ao PCR em tempo real. Os testes LAMP para LIC13162 e LIC20239 não obtiveram implementação LAMP de sucesso. Entretanto, demonstraram estar presentes apenas em leptospiros patogênicos pelo PCR. O LAMP *lipL32* foi padronizado em 30 min de reação e 4 U de enzima. Seu limite de detecção foi de 156 células/ml, apresentando mesmo valor que o qPCR. A sensibilidade analítica do qPCR foi de 16,5 células/ μ l (probit 0,5) e 282 células/ μ l (probit 0,95). Já a sensibilidade analítica do LAMP foi de 25,7 células/ μ l (probit 0,5) e 562 células/ μ l (probit 0,95). A performance diagnóstica do LAMP *lipL32* foi de 84,2% de sensibilidade e especificidade de 93,2%. Os resultados obtidos demonstraram a identificação de dois novos genes de leptospiros patogênicos até então não descritos na literatura, bem como a reafirmação do alvo *lipL32* como excelente alvo para diagnóstico de leptospirose.

Palavras-chave: leptospira; diagnóstico; LAMP

Abstract

PACCE, Violetta. **Development and validation of an isothermal amplification method to detect pathogenic leptospira**. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic species of the genus *Leptospira*, which affects both humans and animals. Due to similarity of clinical signs with other febrile diseases, the diagnosis is a challenge. The current direct and indirect methods are bacterial culture and serological tests. These, on the other hand, presents a variety of disadvantages such as, time-consuming technique and indirect detection of the bacteria by antibodies. So, it is necessary to search for alternative methods for diagnosing leptospirosis. Although there are molecular tests, as PCR, which are efficient and sensitive, they require sophisticated equipment, making its use not viable in underdeveloped countries. The aim of this work was to develop loop-mediated isothermal amplification (LAMP) tests for three different gene targets (LIC13162, LIC20239 and *lipL32*) in order to detect pathogenic leptospira. Primer constructions were made to the three sequences, and tested for different time and enzyme concentration. Analytic performance was evaluated through dilution curve of pure culture of *Leptospira*, with a PROBIT statistical analyses and DNA of various bacteria species. Diagnostic performance was done with 63 (44 negative and 19 positive) samples of hamster renal tissue. Both analyses had their results compared to real-time PCR. LAMP tests for LIC13162 and LIC20239 could not be implemented successfully. However, both showed to be present only in pathogenic leptospira by PCR. The *lipL32* LAMP was standardized in a 30min reaction and with 4 U of enzyme. Its limit of detection was 156 cells/ml, showing the same numeric value of qPCR. Analytic sensibility of qPCR was 16,5 cells/μl (probit 0,5) and e 282 cells/μl (probit 0,95). For the LAMP test, these values were 25,7 cells/μl (probit 0,5) e 562 cells/μl (probit 0,95). Diagnostic performance of *lipL32* LAMP was 84,2% sensitivity and 93,2% specificity. Results showed the identification of two novel genes of pathogenic leptospira that were not yet described in literature, and also the reassurance of *lipL32* as an excellent target gene for diagnosing leptospirosis.

Keywords: leptospira; diagnosis; LAMP

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da reação de LAMP.	26
Figura 2. Fluxograma da análise de identificação de genes de leptospiros patogênicas	31
Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de <i>Leptospira</i> para o gene <i>LIC13162</i> (PCR).....	37
Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de <i>Leptospira</i> para o gene <i>LIC20239</i> (PCR).....	37
Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP com o gene <i>lipL32</i>	38
Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene <i>LIC13162</i> , com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação.....	39
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 30 minutos do gene <i>LIC13162</i> , com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação.....	39
Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene <i>LIC20239</i> (primeiro conjunto de primers), com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação.....	39
Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 30 minutos do gene <i>LIC20239</i> (primeiro conjunto de primers), com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação.....	40
Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene <i>LIC20239</i> (segundo conjunto de primers), com as concentrações de enzima 2 U, 4 U e 8 U/reação.....	40
Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de <i>Leptospira</i> para LAMP <i>lipL32</i>	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação de cepas de <i>Leptospira spp.</i> utilizadas	30
Tabela 2. Sequência dos primers de LAMP para os três genes alvo.....	33
Tabela 3. Sequência dos primers para PCR.....	33
Tabela 4. Ensaio <i>probit</i> com três repetições (qPCR vs LAMP).....	41
Tabela 5. Cálculo de sensibilidade analítica PROBIT (qPCR vs LAMP).....	42

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Leptospira</i> spp.....	15
2.2 Genética da <i>Leptospira</i>	15
2.3 Leptospirose.....	17
2.4 Patogênese	19
2.5 Transmissão.....	20
2.6 Diagnóstico	21
2.6.1 Cultura bacteriana.....	21
2.6.2 Teste de Microaglutinação (MAT)	22
2.6.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	23
2.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
2.6.5 Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP).....	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Cultivo das bactérias e extração de DNA.....	29
4.2 Isolados de <i>Leptospira</i> spp. e amostras clínicas.....	29
4.3 Identificação de genes de espécies patogênicas de <i>Leptospira</i>	30
4.4 Desenho dos primers para LAMP e PCR.....	32
4.5 PCR Convencional.....	34
4.6 PCR em tempo real.....	34
4.7 LAMP	34
4.8 Desempenho analítico (Sensibilidade e especificidade)	35

4.9 Performance diagnóstica.....	35
4.10 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Seleção de genes alvo	36
5.2 Implementação dos procedimentos de amplificação.....	36
5.3 Avaliação da performance analítica do LAMP.....	41
5.4 Performance diagnóstica.....	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO GERAL.....	49
8 REFERÊNCIAS	50
9 ANEXOS	61
Anexo A – Alinhamento de sequências de leptospiros patogênicas e <i>primers</i> do LAMP (LIC13162)	61
Anexo B – Alinhamento de sequências de leptospiros patogênicas e <i>primers</i> do LAMP (LIC20239 – conjunto 1)	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma zoonose negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, as quais são responsáveis por epidemias em regiões tropicais (Haake & Levett, 2015). Nos seres humanos, as estimativas são de 1 milhão de casos e 58.900 mortes por ano em todo o mundo (Costa et al., 2015).

Leptospiras colonizam os túbulos renais de animais carreadores e são disseminadas pela urina (Grassmann et al., 2012). Humanos que entram em contato direto com a urina de animais infectados ou com ambiente úmidos contaminados, estão em risco de desenvolver leptospirose. Essa doença pode afetar tanto humanos como animais, apresentando grande importância para a saúde pública e para a produção de animais (Martins & Lilenbaum, 2013). Esta enfermidade apresenta uma variedade de manifestações clínicas. Muitas vezes a leptospirose anictérica é diagnosticada como febre viral, influenza ou dengue, enquanto a forma que apresenta icterícia pode ser confundida com hepatite viral, septicemia com icterícia ou malária (Vijayachari, 2007). Portanto, um diagnóstico eficiente é necessário para garantir um desfecho clínico favorável (Dey et al., 2008).

O teste padrão para diagnóstico de leptospirose é o Teste de Microaglutinação (MAT, do inglês *Microagglutination Test*), o qual detecta anticorpos aglutinantes (Levett, 2001). Entretanto, o MAT é inadequado para casos de identificação rápida devido à possibilidade de resultados falsos negativos durante infecções agudas. A interpretação do MAT também é difícil em regiões onde a leptospirose é comum, pois uma proporção significativa da população sem a infecção apresenta títulos elevados de anticorpos (Budihal & Perwez, 2014). Além disso, o MAT é um teste bastante subjetivo e que requer a manutenção contínua da cultura de vários sorovares de *Leptospira* e profissionais treinados para sua realização (McBride et al., 2005).

Outros diagnósticos laboratoriais disponíveis incluem microscopia direta, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), isolamento da bactéria, *Western blot* e testes moleculares (Toyokawa et al., 2011; Chen et al., 2015). Testes sorológicos como ELISA e MAT não são capazes de detectar a doença durante sua fase aguda, apenas detectam anticorpos a partir da segunda semana de infecção e apresentam sensibilidade limitada (Sengupta et al., 2017). Testes moleculares como PCR são laboriosos, requerem tempo para processamento e equipamentos mais sofisticados, como termocicladores. Essas

limitações têm estimulado pesquisadores a desenvolverem métodos de amplificação de DNA operacionalmente mais simples e de melhor custo-benefício (Nurul Najian et al., 2016). Em particular, a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*) tem sido aplicada no diagnóstico molecular por promover alta sensibilidade, especificidade e rapidez (Notomi et al., 2000). Diversos estudos tem demonstrado a detecção de vários patógenos pelo método de LAMP (Liang et al., 2009; Mahony et al., 2013; Yang et al., 2018).

A técnica de LAMP envolve o uso de dois pares de *primers* internos (originalmente denominados FIP e BIP) e externos (F3 e B3) específicos e a *Bst* DNA polimerase (Notomi et al., 2000). Podem ser usados também dois *primers* adicionais (*loop F* e *loop B*) de forma a aumentar a sensibilidade e acelerar a velocidade da reação (Nagamine et al., 2002). O teste possibilita a amplificação de DNA de maneira altamente específica sob condições isotérmicas em menos de uma hora. Ensaio de LAMP também podem ser realizados em termoblocos simples, sem necessidade de termocicladores, como na PCR (Yang et al., 2010). Os produtos amplificados podem ser detectados por gel de eletroforese, turbidímetros ou marcadores de fluorescência (Meng et al., 2017; Mori et al., 2001; Mori & Notomi, 2009). Além disso, o LAMP pode ser aplicado tanto no laboratório como no campo, utilizando equipamentos portáteis (Khan et al., 2018).

O LAMP para detecção de leptospira patogênicas foi desenvolvido em estudos prévios com o propósito de diagnosticar casos de leptospirose. Os alvos da bactéria já explorados nesses testes foram os genes codificantes das proteínas LigB (Ali, Kaur, Bobby, T. Sabarinath, et al., 2017), *LipL32* (Hsu et al., 2017), *LipL41* (Chen et al., 2015), *LipL21* (Monica et al., 2019) e do RNA ribossomal 16S (Tubalinal et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método simples, rápido e eficiente para detectar DNA de *Leptospira* a partir da implementação e avaliação comparativa de procedimentos de LAMP, tendo como alvo três diferentes genes específicos desse microrganismo. O teste usando o conjunto de reagentes que demonstrou amplificação específica de *Leptospira* foi submetido a uma avaliação da performance analítica, com determinação da especificidade e sensibilidade diagnóstica, em comparação com método molecular estabelecido (PCR em tempo real).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Leptospira* spp.

Os membros do gênero *Leptospira* são bactérias pertencentes ao filo *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Essas bactérias são longas, finas, espiraladas e apresentam alta motilidade, possuem um diâmetro de aproximadamente 0.1 μm e suas extremidades curvadas em forma de gancho (Levett, 2001). O envelope celular das leptospiros mostra uma estrutura de membrana dupla similar às bactérias Gram-negativas. Entre a membrana interna e externa está o periplasma, no qual se encontra uma parede de peptidoglicano (Picardeau, 2017; Bharti et al., 2003; Cameron, 2015). Essa camada de peptidoglicano é a principal responsável, junto com proteínas do citoesqueleto, pela forma espiralada da bactéria. Sua membrana externa apresenta diferenças na composição em comparação a outras espiroquetas, contendo lipopolissacarídeos (LPS) e grande variedade de proteínas (Haake et al., 2000). A complexidade e a diversidade antigênica do LPS das leptospiros resultaram na classificação em mais de 300 sorovares (Levett, 2015).

Os requerimentos nutricionais para o crescimento de *Leptospira* são fontes de carbono e nitrogênio, vitaminas e suplementos. As bactérias saprófitas e patogênicas crescem em condições aeróbicas, mas diferem na temperatura de crescimento. Saprófitas apresentam temperatura de crescimento ótimo *in vitro* entre 28 e 30°C, mas também crescem em baixas temperaturas (11-13°C). As patogênicas expressam crescimento ótimo entre 28 e 30°C, podendo crescer também à 37°C e não em temperaturas baixas. O pH ótimo para crescimento é entre 7,2 e 7,6 (Cameron, 2015).

O ciclo de vida das leptospiros patogênicas inclui ambiente natural, reservatórios assintomáticos e hospedeiros susceptíveis, sendo assim bastante complexo. É importante ressaltar que o tropismo do agente infeccioso não se limita a um único hospedeiro, mas a vários que podem ser portadores assintomáticos (Ko et al., 2009; Vincent et al., 2019).

2.2 Genética da *Leptospira*

O gênero *Leptospira* é altamente heterogêneo em termos de genética, resultando em uma ampla biodiversidade da bactéria. Taxonomicamente, o gênero foi subdividido em 35 espécies (Karpagam & Ganesh, 2020). Essas foram ordenadas em

três clados principais de acordo com sua virulência: patogênicas, intermediárias e saprófitas. Os agentes infecciosos da leptospirose pertencem a dois subclados: as patogênicas (13 espécies) e as intermediárias (11 espécies) (Picardeau, 2017).

As espécies patogênicas são as responsáveis pelas infecções mais severas, tanto em humanos quanto animais. Ainda assim, sabe-se pouco sobre quais os componentes das espiroquetas são críticos para a virulência. As espécies do clado intermediário são altamente distribuídas no ambiente (Thibeaux et al., 2018; Masuzawa et al., 2018; Lall et al., 2016) e podem ser responsáveis por infecções moderadas em humanos e animais (Matthias et al., 2008; Tsuboi et al., 2017; Chiriboga et al., 2015). As intermediárias possuem alguns dos fatores de virulência encontrados nas patogênicas (Fouts et al., 2016; Picardeau, 2017). Em contraste, as saprófitas formam um único clado contendo onze espécies que são consideradas bactérias ambientais não-patogênicas (Picardeau, 2017).

O genoma da *Leptospira* consiste em dois cromossomos circulares e já estão disponíveis as sequências completas de centenas de cepas. O tamanho total varia de 3.450.369 a 5.267.277 pares de bases. Espécies patogênicas têm um tamanho de genoma heterogêneo, o qual é maior que a das intermediárias, que por conseguinte é maior que o das saprófitas (Guglielmini et al., 2019). O genoma é grande quando comparado com outras espiroquetas como *Treponema spp.* e *Borrelia spp.*, o que possivelmente está relacionado com a habilidade das *Leptospira spp.* sobreviverem em diferentes situações, tanto em hospedeiros animais como livres no ambiente (Bharti et al., 2003; Picardeau et al., 2008).

O conteúdo de guanina e citosina (G+C%) no genoma é mais alto em espécies intermediárias (42,39%) do que em saprófitas (38,27%). Nas patogênicas esse conteúdo varia entre 35 e 40%. Um estudo comparou as relações filogenéticas entre todas as espécies de *Leptospira* em cinco formas diferentes: um conjunto principal de genes constitutivos codificantes de proteínas (*housekeeping genes*); um conjunto pan-gênero de 1.350 proteínas; tipagem por sequenciamento de múltiplos locus (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) com os alelos *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* e *caiB*; sequenciamento dos genes do RNA ribossomal 16S (altamente conservado) e *secY* (altamente variável). Cada abordagem resultou em diferentes grupos e ramos das espécies analisadas. As posições filogenéticas mudaram até certo ponto entre as análises baseadas em locus único e tornaram-se mais

consistentes usando as abordagens de multilocus (Fouts et al., 2016; Guglielmini et al., 2019).

Recentemente, um estudo reformulou a classificação taxonômica propondo 64 espécies de *Leptospira*, sendo 35 já descritas anteriormente e 29 novas (Vincent et al., 2019). Assim, foram classificadas em dois grandes clados: as saprófitas, que contém espécies isoladas do ambiente e não são responsáveis por infecção; e as patogênicas, contendo as espécies que causam infecção e as intermediárias, ou seja, que não tem status de virulência bem definidos. Ambos os clados puderam ser divididos em dois subclados cada. Foi também proposta uma nova nomenclatura: clados P e S, além de subclados P1 (anteriormente descritos como grupo patogênico), P2 (anteriormente descritos como grupo intermediário), S1 (anteriormente descrito como grupo saprofítico) e S2, que consiste de um subclado filogeneticamente distinto e que apresenta características saprofíticas semelhantes às do grupo S1 (Guglielmini et al., 2019).

Estudos demonstram que o subclado P1 apresenta o pangenoma mais aberto, sugerindo grande diversidade de genes nesse subclado específico. O genoma das espécies pertencentes ao P1 tendem a ser maiores, com maior concentração de CG (característica também de P2), abrigam genes codificadores de tRNAs, tem menos genes codificantes e consequentemente e apresentam mais pseudogenes (Vincent et al., 2019).

2.3 Leptospirose

A leptospirose é a zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (Haake & Levett, 2015). Essa doença tem se disseminado das áreas rurais para os centros urbanos causando epidemias, principalmente nos países em desenvolvimento. Surtos ocorrem durante períodos sazonais de chuvas intensas e os grupos de risco normalmente são as comunidades mais pobres (Costa et al., 2015; Conrad et al., 2017). Além disso, animais de produção, como bovinos, ao contrair a leptospirose podem apresentar diminuição nos índices de produtividade, acarretando grandes perdas econômicas (Ellis, 2015).

Estima-se que a leptospirose venha a se tornar mais frequente em todo mundo devido às mudanças climáticas e à crescente população urbana que vive em favelas (Guglielmini et al., 2019). Entretanto, os dados epidemiológicos atuais de leptospirose são subestimados, pois a maioria dos países não consegue realizar os testes

diagnósticos laboratoriais necessários para a vigilância da doença (Conrad et al., 2017; Levett, 2015).

Aproximadamente, 1,3 milhão de casos de leptospirose humana são registrados mundialmente a cada ano, dos quais 58.900 resultam em morte (Costa et al., 2015). Ainda assim, a leptospirose não se encontra mais na lista de doenças tropicais negligenciadas que são consideradas prioridade pela OMS - Organização Mundial da Saúde (Molyneux et al., 2017). Agora, é considerada uma doença infecciosa reemergente ligada à uma combinação de fatores, os quais incluem o aumento da produção pecuária, o acesso limitado à provisão de saúde para animais e humanos e às mudanças climáticas ambientais (Goarant et al., 2019; Hotez, 2016; Mwachui et al., 2015). Observa-se que o risco da leptospirose aumenta com a frequência de eventos climáticos extremos e grandes mudanças no uso de terras (Pappas et al., 2008; Picardeau, 2015).

O Brasil está entre os primeiros 17 países do mundo com alta prevalência de leptospirose humana. O estado do Rio Grande do Sul, localizado em uma região subtropical, apresenta uma produção pecuária muito densa e é o 5º estado com maior incidência de leptospirose humana no Brasil (4,7 casos entre 10.000 habitantes) (SEAPI-RS, 2018; Ministério da Saúde do Brasil, 2018). Além disso, o Rio Grande do Sul é considerado um dos estados onde o controle e prevenção da leptospirose devem ser priorizados no Brasil (Baquero & Machado, 2018).

Em teoria, qualquer *Leptospira* patogênica pode infectar qualquer espécie animal e assim desencadear a doença, ainda que cada sorovar seja normalmente mantido na natureza por uma espécie animal em particular (Ellis, 2015). As maiores exceções são os ratos e camundongos, que não desenvolvem os sinais da doença na infecção pelas diferentes espécies de *Leptospira* (McBride et al., 2005). Adicionalmente, algumas espécies animais são reservatórios de alguns sorovares que estão bem adaptados a estes hospedeiros específicos. Os ratos são os principais hospedeiros do sorogrupo Icterohaemorrhagiae; bovinos e caprinos do sorogrupo Hardjo; suínos e cães dos sorogrupos Canicola e Bratislava (Ellis, 2015).

O desfecho clínico da leptospirose em humanos pode variar devido a diferentes fatores, tanto do patógeno (sorovar da *Leptospira*, genes de virulência, etc.) como do hospedeiro (idade, saúde e competência imunológica do indivíduo infectado). A infecção por leptospira patogênica produz uma ampla variedade de manifestações clínicas que incluem desde doença febril indiferenciada até doença de Weil. Esta é a

forma mais grave caracterizada por complicações de vários órgãos, incluindo icterícia, meningite, hemorragia pulmonar, disfunções hepáticas e renais (Evangelista & Coburn, 2010; Adler & de la Peña Moctezuma, 2010; Murray, 2015b).

Como as manifestações clínicas da leptospirose em humanos podem ser semelhantes a outras doenças, o diagnóstico definitivo é uma tarefa desafiadora. A leptospirose anictérica é comumente confundida com febre viral, influenza ou dengue; enquanto a leptospirose ictérica pode ser mal diagnosticada como hepatite viral, septicemia com icterícia ou malária (Vijayachari, 2007). Portanto, um diagnóstico correto é necessário para certificar determinado desfecho clínico (Dey et al., 2008).

2.4 Patogênese

A compreensão sobre os mecanismos específicos de patogênese da leptospirose ainda é limitada. Ainda não se sabe exatamente qual é a contribuição dos efeitos diretos causados pela infecção bacteriana e da resposta imune do hospedeiro na gravidade da leptospirose (Bharti et al., 2003). Ao entrar em contato com o hospedeiro, acredita-se que as bactérias penetram pelas membranas mucosas ou lesões da pele (Ellis, 2015). A motilidade da *Leptospira* tem como função a penetração de mucosas e o deslocamento entre as camadas celulares (Faine et al., 1999; Murray, 2015b). Sendo assim, demonstrou ser um fator importante na infecção inicial e na disseminação de organismos da porta de entrada para órgãos como fígado, rim, olhos e cérebro (Bharti et al., 2003).

Consistente com a habilidade prevista de migrar pelos tecidos do hospedeiro, a *Leptospira* possui uma variedade de fatores de virulência em potencial que podem facilitar esse processo. Atividades hemolíticas e as ações da esfingomielinase e fosfolipase foram descritas *in vitro* há muito tempo, sendo que genes específicos foram caracterizados incluindo hemolisinas, esfingomielinases C ou H e proteína-1 associada à hemólise (Hap1, mais conhecida como *LipL32*) (del Real et al., 1989). A ausência de genes de esfingomielinases em leptospiros saprófitas sugere provável função na virulência ou na sobrevivência no hospedeiro (Evangelista & Coburn, 2010).

Os mecanismos patogênicos da leptospirose podem ser divididos nos efeitos diretos da infecção bacteriana e na resposta imune do hospedeiro. O período de bacteremia, o qual pode durar por uma semana, começa 1 ou 2 dias após a infecção. Durante esse período, leptospiros podem ser isoladas do sangue e da maioria dos órgãos incluindo fluído cefalorraquidiano. Essa primeira fase bacterêmica termina com

o aparecimento de anticorpos circulantes, os quais são detectáveis normalmente após 10 a 14 dias (Ellis, 2015; Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Recentemente, um estudo que buscou localizar regiões CRISPR em *Leptospira* identificou a presença de sistemas CRISPR-Cas exclusivamente em espécies infecciosas da bactéria, sendo que nas cepas mais patogênicas foram encontrados dois subtipos diferentes de CRISPR-Cas, indicando um possível papel na patogenicidade (Xiao et al., 2019).

Um dos mecanismos de sobrevivência usado parece ser a evasão ao ataque do sistema imune do hospedeiro. Algumas evidências já demonstraram a capacidade da bactéria de recrutar proteínas que inativam o sistema complemento, protegendo-as do ataque do mesmo (Murray, 2015a). Outros estudos mostram a capacidade dessas bactérias permanecerem temporariamente no interior de células fagocíticas (Barocchi et al., 2002) e persistir em macrófagos (Toma et al., 2011).

Enquanto fatores bacterianos contribuem para o resultado da infecção, os fatores do hospedeiro demonstram ser igualmente importantes, como o reconhecimento imune. Nos humanos, a sinalização por macrófagos acontece via TLR2 (ao invés de TLR4, receptor usual de LPS), enquanto a sinalização pelas células murinas acontece via TLR2 e TLR4 (Nahori et al., 2005). O reconhecimento por TLR4 é importante para a resistência à leptospirose aguda, de forma que ratos com deficiência em TLR4 se tornam susceptíveis à leptospirose (Viriyakosol et al., 2006; Chassin et al., 2009). A diferença entre o reconhecimento humano e murino parece contribuir para os resultados contrastantes da doença (Werts, 2010; Murray, 2015a).

2.5 Transmissão

As leptospirosas patogênicas estão altamente distribuídas na natureza, infectando principalmente o tecido renal de diversos hospedeiros animais. O ciclo de vida da *Leptospira* envolve a eliminação das bactérias via urina, persistência no ambiente, infecção de um novo hospedeiro com disseminação hematogênica para os rins pelos glomérulos ou capilares peritubulares. Uma vez que as bactérias obtêm acesso ao lúmen do túbulo renal, colonizam o epitélio permitindo sua eliminação na urina por longos períodos de tempo (Haake & Levett, 2015).

Muitas espécies animais (domésticas, selvagens e o próprio homem) podem ser afetadas pela leptospirose (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). A transmissão da bactéria pode ocorrer indiretamente pelo contato com água/solo contaminado

(Faine et al., 1999) ou diretamente com a urina de um animal infectado (Picardeau, 2013). Em animais domésticos e selvagens, carreadores crônicos mantêm bactérias viáveis, as quais podem ser excretadas via urina, tornando-se fontes de infecção para humanos e outros animais (Monahan et al., 2009).

Pequenos mamíferos são conhecidos pelo carreamento renal das bactérias. *Leptospira* já foi isolada de animais como roedores, morcegos e marsupiais, sendo que os primeiros são considerados os mais importantes reservatórios. Estudos demonstraram que os ratos infectados eliminam urina com altas concentrações de bactéria (10^7 organismos por ml) (Ko et al., 2009). A transmissão da doença também é bastante influenciada por condições ambientais que afetam a biologia, comportamento e abundância das espiroquetas e de seus hospedeiros (Bharti et al., 2003; Mutalip et al., 2019).

A infecção direta de humanos a partir de reservatórios animais pode acontecer em contextos ocupacionais. Fazendeiros, açougueiros, veterinários e profissionais de controle de roedores, por exemplo, podem estar diretamente expostos à urina infectada. O Centro de Controle de Doenças (CDC, do inglês *Centers of Disease Control and Prevention*) lista veterinários e cuidadores de animais como profissões de risco para leptospirose, e recomendam evitar o contato com urina de animais potencialmente infectados (Divers et al., 2019). Entretanto, evidências sugerem que a exposição indireta à água, solo e lama contaminados ainda predomina no maior número das infecções humanas (Goarant, 2016; Marquez et al., 2017).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Cultura bacteriana

O cultivo bacteriano consiste no isolamento de *Leptospira* a partir de amostras de tecidos, urina ou sangue (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). As amostras devem ser cultivadas em meio de cultura *Ellinghausen McCullough Johnson Harris* (EMJH), com adição de antibióticos ou agentes seletivos em caso de contaminação. Assim, são incubadas em estufa à 28-30 °C por ao menos oito semanas, e analisadas semanalmente pela microscopia de campo escuro (Levett, 2001; Eldin et al., 2019).

Apesar da cultura apresentar especificidade elevada, a sensibilidade é normalmente muito baixa (Levett, 2001). O tempo de duplicação da bactéria é relativamente longo (6-8 horas ou mais), e seu cultivo pode levar até 3 meses (Gurumurthy et al., 2018), tornando-o impraticável para diagnóstico imediato. Por essa

razão, não é muito utilizada na rotina clínica. Além disso, as análises bacteriológicas necessitam de instalações de biossegurança nível 2 por serem organismos infecciosos ao homem (Budihal & Perwez, 2014).

Na maioria dos estudos publicados, pode-se observar que existem diferenças na maneira de cultivar as bactérias: EMJH líquido ou semi-sólido, suplementação com Tween 80/40 ou soro de coelho, com ou sem agentes seletivos (5-fluorouracil, neomicina, bacitracina e actidiona). Portanto, a técnica de cultura ainda não é definitiva e aperfeiçoamentos no isolamento são necessários (Ellis, 2015). A dificuldade em recuperar bactérias viáveis (devido à contaminação frequente, crescimento fastidioso, necessidade de uso de meios de cultura especializados) resulta em baixa sensibilidade diagnóstica (Girault et al., 2017; Miotto et al., 2017). Entretanto a cultura ainda é o teste mais aceitável para confirmar a infecção, apresentando um papel importante em determinar a epidemiologia global da infecção (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

2.6.2 Teste de Microaglutinação (MAT)

O teste rápido considerado padrão para o diagnóstico da leptospirose é o Teste de Microaglutinação (MAT) (WHO, 2003). O MAT se baseia na aglutinação de soro diluído com suspensões vivas de bactérias. Assim, quando o soro do paciente apresenta anticorpos anti-leptospira, ocorre a formação de aglomerados que podem ser observados através de microscopia de campo escuro (Santos, 2011).

A maior vantagem do MAT é sua ótima especificidade pois consegue detectar anticorpos sorovar-específicos (WHO, 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que seja mantida uma bateria de no mínimo 19 antígenos vivos diferentes para o teste, tornando-o impraticável para a grande maioria dos laboratórios (Brownlow et al., 2014).

O uso do MAT apresenta diversas limitações e seus resultados devem ser interpretados com cuidado. O teste apresenta baixa sensibilidade durante estágios iniciais da doença, pois existe o risco do paciente ainda não apresentar soroconversão; e múltiplas amostras das fases aguda e convalescente são necessárias para a confirmação da infecção (Budihal & Perwez, 2014; WHO, 2003; Miller et al., 2011). A interpretação dos dados sorológicos pode ser confusa quando se fala em animais recentemente imunizados ou que apresentam status de imunização desconhecido. A identificação de indivíduos com infecção crônica usando

MAT pode ser desafiadora, visto que os títulos séricos não estão necessariamente associados com presença de leptospiras no tecido renal (André-Fontaine, 2006).

O critério padrão para um MAT positivo é o aumento do título de anticorpos em quatro vezes, ou a conversão de soronegatividade para um título de 100 ou mais elevado (Bharti et al., 2003). Em áreas onde a leptospirose é rara, um título baixo provavelmente apresenta valor diagnóstico, mas ainda assim deve ser avaliado em conjunto com fatores clínicos e epidemiológicos (exposição, grupo de risco). Já em regiões onde a leptospirose é endêmica, muitos indivíduos podem apresentar anticorpos persistentes devido a infecções anteriores e títulos baixos em uma única amostra pode, portanto, ser de difícil interpretação (WHO, 2003; Budihal & Perwez, 2014).

2.6.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Devido à complexidade do MAT, foram desenvolvidos testes mais práticos e rápidos para detecção de anticorpos circulantes. Os testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-leptospira foram implementados utilizando diferentes preparações de antígeno, protocolos e plataformas de ensaio (em placa ou em tiras). O antígeno utilizado determina a especificidade do teste. As preparações de antígenos são em sua maioria células inteiras ou proteínas de membrana externa (OMP, do inglês *Outer Membrane Protein*), com ênfase nessa última (Ellis, 2015).

Vários testes ELISA permitem a detecção de IgM anti-leptospira, os quais têm sido comercializados no passar dos últimos anos. Esses testes apresentam melhor padronização e são mais facilmente executados. Seu valor comercial é variável e depende da qualidade do teste (sensibilidade podendo variar de 4% a 97%). O período de realização do teste interfere diretamente no resultado do teste. A sensibilidade é menor quando realizada durante a primeira semana da infecção. Estudos que realizam o teste sorológico após o dia 7 descrevem valores de sensibilidade e especificidade entre 75% e 100%, e 78% e 97%, respectivamente (Bajani et al., 2003; Levett & Branch, 2002; Yersin et al., 1999).

A performance geral do ELISA sugere sua aplicabilidade como um teste de triagem rápido para o diagnóstico de leptospirose em locais com recursos limitados e em laboratórios ou hospitais onde o MAT não é disponibilizado (Bourhy et al., 2013). Esses testes portanto são recomendados como estratégias primárias durante a fase imune da infecção, com a confirmação secundária pelo MAT (Eldin et al., 2019).

Entretanto, existem significativas limitações de diagnóstico precoce com a utilização de qualquer teste sorológico, e o teste com uma segunda amostra deve ser considerado obrigatório (Levett, 2015). Além disso, a confirmação dos resultados de testes diagnósticos rápidos por um teste de referência também é recomendada (Goris et al., 2013).

2.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Como o isolamento de *Leptospira* requer algumas semanas para o crescimento da cultura e os testes sorológicos apresentam baixa sensibilidade na fase aguda da doença (Toyokawa et al., 2011), foram desenvolvidos métodos alternativos. As técnicas baseadas em PCR e suas diversas variações como multiplex PCR (Ahmed et al., 2012), nested-PCR (Jouglaud et al., 2006), PCR-RFLP (Jung et al., 2015) e PCR em tempo real (Wunder et al., 2016) têm sido desenvolvidas para detectar cepas patogênicas de *Leptospira* e assim obter um diagnóstico precoce (Picardeau, 2013). Este é importante para confirmar a doença visto que o tratamento com antibióticos é mais eficaz quando estabelecido na fase inicial da doença (Bourhy et al., 2011).

A detecção molecular de *Leptospira* é comumente baseada na amplificação de sequências bacterianas específicas de genes como *16S rRNA*, *flaB*, *ompL1*, *lipL32*, *lipL4*, *lipL25*, *ligA* e *ligB*. O gene da *lipL32* codifica para uma lipoproteína de membrana externa presente nas espécies patogênicas, mas ausente nas saprófitas (Haake et al., 2000). O gene da *lipL21* codifica para outra lipoproteína de membrana externa, com expressão variável. Alguns estudos relataram a presença da *lipL21* apenas em espécies patogênicas, podendo então ser utilizada como marcador diagnóstico (Cullen et al., 2003; Seenichamy et al., 2014). Porém, um estudo recente com análises genômicas demonstra que espécies patogênicas e saprófitas possuem esse gene, com significantes variações de nucleotídeos (Monica et al., 2019).

Já foi relatado que os genes *lipL32* e *16S rRNA* são eficientes para detectar amplificação de *L. interrogans*. Porém, o *16S rRNA* demonstrou ser menos específico quando comparado ao gene da *lipL32* (Villumsen et al., 2012). Outro gene bastante utilizado é o da proteína de membrana externa *OmpL1*, que consegue detectar e diferenciar espécies de *Leptospira* patogênicas, mas também demonstrou ser menos sensível (87%) do que os anteriores (GÖKMEN et al., 2016).

Recentemente, o PCR em tempo real (qPCR) vem sendo utilizado como uma ferramenta rápida e sensível para detecção de DNA. O PCR em tempo real vem

substituindo o PCR convencional, com maiores valores de sensibilidade e especificidade (96% e 100%, respectivamente) (Eldin et al., 2019). Estudos de qPCR para detecção de leptospira utilizando genes alvo como *lipL32* apresentou especificidade geral de 99% (Riediger et al., 2017), e em outros até mesmo 100% para sensibilidade e especificidade (Stoddard et al., 2009). Os PCRs convencionais e em tempo real são especialmente úteis para o diagnóstico em fases iniciais da infecção, ou seja no período da janela imunológica quando a produção de anticorpos ainda não começou (Toyokawa et al., 2011).

A implementação de técnicas de alta sensibilidade requer laboratórios especializados, equipes treinadas, equipamentos e reagentes de alto custo, podendo inviabilizar a implementação em países subdesenvolvidos e com poucos recursos. Com isso, é crucial estabelecer uma abordagem simples, rápida e sensível para uma detecção de bactérias tanto no laboratório como até mesmo no campo (Khan et al., 2017; Monica et al., 2019).

2.6.5 Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP)

A técnica de amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP, do inglês *Loop-mediated Isothermal Amplification*), foi desenvolvida há quase 20 anos e demonstrou características de rapidez, simplicidade e elevada especificidade (NOTOMI et al. 2000). O LAMP é um procedimento de amplificação de DNA que pode ser realizado à uma temperatura constante com uma única enzima (Tomita et al., 2008). O método utiliza um mínimo de quatro *primers*, dois internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3), que reconhecem seis regiões diferentes no DNA alvo (Mori & Notomi, 2009). Mas o principal diferencial é o uso da enzima *Bst* DNA polimerase, que não possui atividade exonucleásica 5' - 3' e portanto possibilita o deslocamento da fita inteira de DNA (na medida que ocorre a síntese de uma nova cadeia polinucleotídica a partir da fita molde de DNA complementar), sem necessitar a elevação da temperatura para a desnaturação. Portanto, a amplificação pode ser realizada em condições isotérmicas, preferencialmente a 60°C, temperatura de atividade ótima da enzima (Zatti, 2016; Notomi et al., 2000).

Na reação de LAMP, a amplificação gênica acontece em duas etapas: a cíclica e a não-cíclica (Figura 1). A última é caracterizada pelo início da amplificação, onde é formada uma estrutura em alça. Já a etapa cíclica é constituída pela auto síntese, onde a alça formada na etapa anterior é utilizada como molde para ligação dos *primers*

internos e alongamento da fita, gerando vários novos fragmentos de tamanhos diferentes (Notomi et al., 2015; Oliveira, 2016; Tomita et al., 2008).

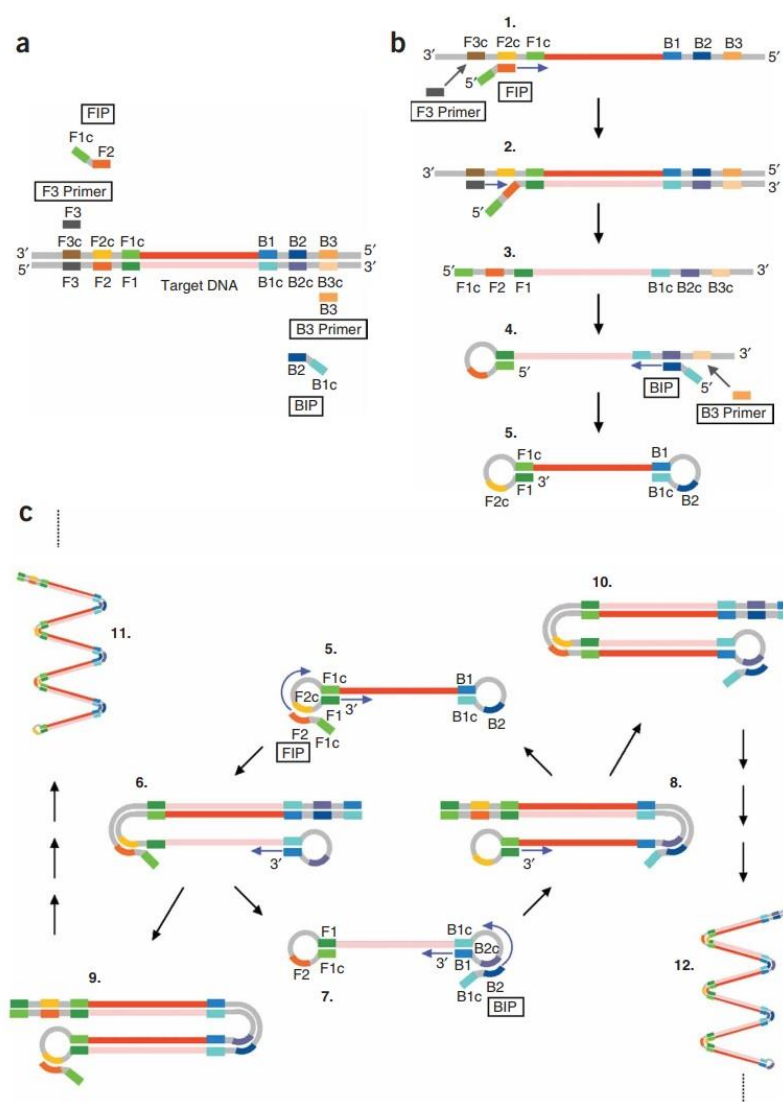


Figura 1. Representação esquemática da reação de LAMP. A) Desenho dos *primers* designados para as seis regiões distintas do DNA alvo, denominadas F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3. B) Etapa não-cíclica, onde ocorre a formação da estrutura de alça. C) Etapa cíclica. Fonte: TOMITA et al., 2008

Ao final da reação, o produto amplificado pode ser detectado por eletroforese em gel, turbidimetria, marcadores de fluorescência, em alguns dos casos possibilitando a visualização a olho nu por mudanças físico-químicas no tubo de reação (Meng et al., 2017; Mori et al., 2001; Mori & Notomi, 2009; Shirato, 2019). O LAMP pode ser realizado no laboratório ou mesmo no campo, com a utilização de instrumentos portáteis (Khan et al., 2018).

Inúmeros estudos já foram publicados com a utilização do LAMP nas mais diversas aplicabilidades. Na detecção de patógenos que causam doenças infecciosas, o teste já foi desenvolvido para *Salmonella* (Abdullah et al., 2014; Yang et al., 2018), *Klebsiella pneumoniae* (Nakano et al., 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Kaewphinit et al., 2017; Bentaleb et al., 2016), *Listeria monocytogenes* (Ye et al., 2015; Birmipa et al., 2015) e até *Leptospira* (Hsu et al., 2017; Ali, Kaur, Bobby, T Sabarinath, et al., 2017). Além de detectar doenças em plantas (Si Ammour et al., 2017), detectar fungos (Niessen, 2015) e até mesmo ser utilizado para a sexagem de embriões bovinos (Hirayama et al., 2004).

O LAMP demonstrou tolerância a substâncias inibitórias presentes em amostras biológicas. Além disso, os métodos de extração rápidos e simples permitem evitar complicados protocolos de purificação de DNA (Niessen, 2015; Khan et al., 2017; Si Ammour et al., 2017). Portanto, o LAMP é avaliado como um método sensível, de boa relação custo benefício, fácil realização e com possível aplicação como um teste *point-of-care* (Notomi et al., 2015; Khan et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar método de amplificação isotérmica para detecção de *Leptospira* utilizando diferentes genes alvos.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer métodos de PCR tendo como alvo os genes LIC13162 e LIC20239;
- Desenvolver métodos de amplificação isotérmica (LAMP) tendo como alvos LIC13162 e LIC20239;
- Validar o método de amplificação isotérmica baseada no gene alvo *lipL32*;
- Validar os métodos desenvolvidos com amostras clínicas (tecido renal);
- Comparar os métodos dos diferentes genes alvo entre si;
- Comparar os métodos de amplificação isotérmica com a técnica de PCR em tempo real.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo das bactérias e extração de DNA

O cultivo de cepas de *Leptospira* spp. foi realizado em meio *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH) com adição de suplemento (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil). Os cultivos foram armazenados em estufa à 30°C. O DNA genômico dos cultivos foi extraído com a utilização do *Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA).

O cultivo da *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 foi submetido à uma contagem de bactérias através de câmara de Petroff-Hausser, a qual demonstrou presença de 2×10^8 células/ml. O DNA desse cultivo foi então extraído em 100 µl de eluído e armazenado para a utilização na realização dos diferentes testes.

4.2 Isolados de *Leptospira* spp. e amostras clínicas

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Vacinologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas (UFPel) (Tabela 1).

As amostras clínicas foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Thais Larré Oliveira do Laboratório de Vacinologia da UFPel. Elas consistiram de DNA já extraído de amostras de tecido renal de hamsters pertencentes à um estudo experimental de vacinas (Oliveira et al., 2019). Os animais haviam sido infectados com uma dose de 10^3 leptospiros. A presença de leptospiros no tecido renal já havia sido confirmada por cultivo microbiológico em meio EMJH e PCR em tempo real.

Tabela 1. Classificação de cepas de *Leptospira* spp. utilizadas

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Cepa	Tipo
<i>L. biflexa</i>	-	-	Patoc	saprófita
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarasovi	Tarassovi	-	patogênica
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	-	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz L1-130	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	Copenhageni	-	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Pomona	-	-	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	JEZ Bratislava	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	-	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	Hardjoprajitno	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	-	patogênica
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	patogênica
<i>L. kirshneri</i>	-	-	Mozdok	patogênica
<i>L. kirshneri</i>	Gryppotyphosa	Gryppotyphosa	-	patogênica
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K	patogênica
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342K	patogênica

4.3 Identificação de genes de espécies patogênicas de *Leptospira*

A seleção dos genes alvo para os ensaios de PCR e LAMP foi realizada a partir da análise comparativa de genomas de 20 espécies de *Leptospira*, englobando 14 espécies patogênicas ou intermediárias (patogênicas oportunistas) e 6 saprófitas (FOUTS et al., 2016). Para cada genoma foi efetuada uma reanotação de sequências codificantes usando o software Prodigal, sendo as sequências derivadas de todos os genomas processadas para geração de um banco de dados para realização de análise pelo BLASTn. Sequências representativas foram agrupadas pelo software *clustering* CD-HIT. Estas foram então comparadas com o banco de dados de todas as sequências, sendo selecionadas apenas aquelas que apresentaram ao menos um hit com 90% de similaridade em todas as sequências de cepas patogênicas e nenhum hit com *e-value* < 1 e -10 em nenhuma das cepas saprófitas. Posteriormente, as sequências selecionadas foram comparadas aos genomas originais usando o

BLASTn de modo a remover aquelas que apresentassem alinhamento com regiões do genoma das cepas saprófitas com *e-value* menos que $1e-10$. Ao final, chegou-se à lista de seqüências de dois genes alvo: *LIC13162* e *LIC20239*.

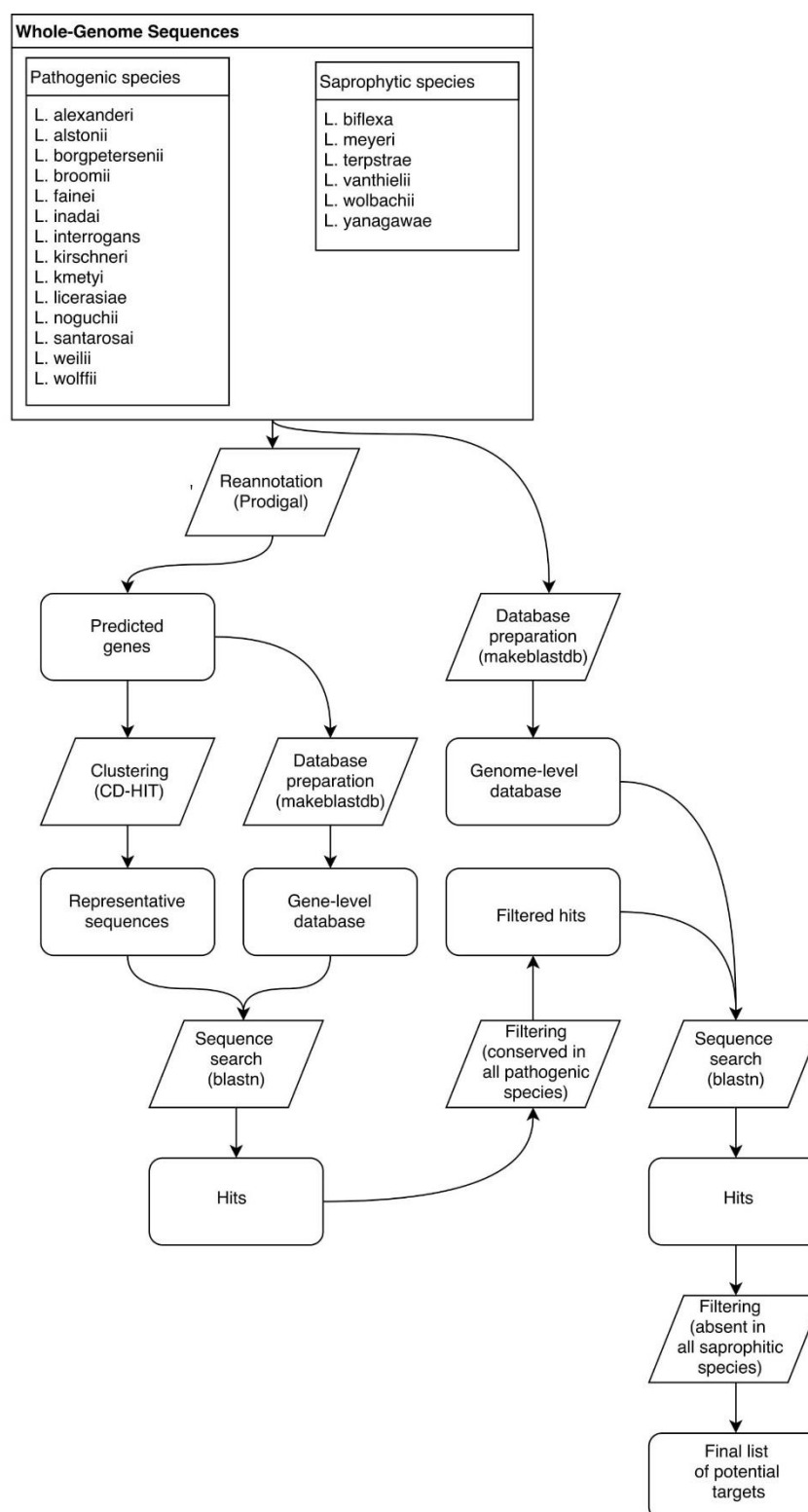


Figura 2. Fluxograma da análise de identificação de genes de leptospiros patogênicas

4.4 Desenho dos primers para LAMP e PCR

Um alinhamento de sequências dos genes *LIC13162* e *LIC20239* referentes à nove espécies de *Leptospira* patogênicas (acesso GenBank: NZ_AHNP02000000, NZ_AOHB02000000, NZ_AHMP02000000, NZ_AHNC02000000, NZ_AOHD02000000, NZ_AHMT02000000, NZ_AHMN02000000, NZ_AKWY02000000, AE016823.1) foi realizado com finalidade de encontrar sequências comuns para todas as espécies.

A sequência L1130 foi utilizada como referência para o desenho dos *primers*. Dessa forma, conjuntos foram desenhados através do *software PrimerExplorer* (<https://primerexplorer.jp/e/>), o qual é especializado em LAMP. Dos conjuntos de *primers* possíveis apresentados pelo sistema, parâmetros referentes à temperatura de anelamento e estabilidade (medida em kcal/mol) foram levados em consideração na escolha do melhor conjunto de *primers* para ambos os genes (Tabela 2).

As sequências de *primers* desenhadas para as reações de LAMP foram submetidas ao *software Clustal Omega Alignment* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) juntamente com as sequências de cada gene para uma comparação. Dessa forma, ajustes na construção dos *primers* foram realizados, prevendo manter o máximo de semelhança dos *primers* com as sequências alvo de todas as espécies comparadas (Anexo A e B).

Para o desenho dos *primers* para as reações de PCR convencional, o *software Geneious R11* (<https://www.geneious.com/>) foi utilizado para um alinhamento prévio das sequências de ambos os genes. Foram selecionadas regiões de maior semelhança entre as espécies comparadas e com o menor número de SNPs possíveis. Utilizando a sequência da *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 como referência, os *primers* foram escolhidos manualmente comparando a semelhança das sequências entre todas as espécies. Análises da temperatura de anelamento e presença de dímeros e *hairpins* foram avaliadas pelos *softwares Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e *Oligo Analyzer IDT* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). As sequências dos *primers* de PCR convencional para as duas novas regiões, *LIC13162* e *LIC20239*, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2. Sequência dos primers de LAMP para os três genes alvo

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
<i>LipL32-F3</i>	TGTTTGGATTCTGCCGTAA	Hsu et al., 2017
<i>LipL32-B3</i>	GCAGCTTTGGCGATTTGG	Hsu et al., 2017
<i>LipL32-FIP</i>	CTCCATCGCCTGGTTCACCGTCGC-TGAAATGGGAGTTTCG	Hsu et al., 2017
<i>LipL32-BIP</i>	AGCGGCTACCCCAGAAGAAAA-AAGGCATAATCGCCGACATTC	Hsu et al., 2017
<i>LipL32-LF</i>	TCGCCTGTTGGGGAAATCA	Hsu et al., 2017
<i>LIC13162-F3</i>	CAAGCCGTCGAACCTGGTAA	Neste estudo
<i>LIC13162-B3</i>	CTGAATCATATCTGCGTGTTTAGC	Neste estudo
<i>LIC13162-FIP</i>	CCGAGACCGCGCCAATCG-AATCATCTTTTCGAGGTGGAGC	Neste estudo
<i>LIC13162-BIP</i>	GGTCAAAGCAGAACTGGACTTCCT-ACTTCTTCGCCATCGTATG	Neste estudo
<i>LIC13162-LF</i>	CGCCAATCGGTTGGACGA	Neste estudo
<i>LIC20239-F3</i>	CGTTGACCTGTCAGGTGC	Neste estudo
<i>LIC20239-B3</i>	GCAGCCTGATTATCAATGAGATC	Neste estudo
<i>LIC20239-FIP</i>	ACAACAACCACGCGCTCAC-CGACGATTAAGTCGGTTTTTCATAG	Neste estudo
<i>LIC20239-BIP</i>	TCCCATTTTTCGATTTCATACCTGGC-CCACAGGTAAATACGTCCACG	Neste estudo
<i>LIC20239-F3 2</i>	AGTCCGTATGGAGTGAGC	Neste estudo
<i>LIC20239-B3 2</i>	CTACGCCTAAGTTCAGTACA	Neste estudo
<i>LIC20239-FIP 2</i>	GTCCACGGCACAATAACCGT-GTTAGTGAATCCCATTTTGCG	Neste estudo
<i>LIC20239-FIP 2b</i>	ACAACAACCACGCCGCTCACTTTTGACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGG	Neste estudo
<i>LIC20239-BIP 2</i>	GGCTGCCCTGGATTATCTAAAAGAGA-CCACGTTTCATTTCCACAAC	Neste estudo

Tabela 3. Sequência dos primers para PCR

Primer	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)
LIC1 Primer F	GGTYTCGGTTGGGAAGG	85
LIC1 Primer R	TATGATCCATMACTTCGGTCA	
LIC2 Primer F	GCCCTGGATTATCTAAAAGAGAA	93
LIC2 Primer R	TGAAGGTCTACGCCTAAGTTC	

4.5 PCR Convencional

Dois testes de PCR convencional foram estabelecidos para amplificação dos genes *LIC13162* e *LIC20239*, de modo a confirmar a existência de ambos os genes em bactérias patogênicas.

A concentração dos *primers* a ser adicionada no mix foi previamente determinada segundo protocolo padrão da empresa Simbios Biotecnologia Ltda. Na reação, são adicionados 27,80 µl de Mastermix, 0,20 µl da Taq polimerase e 2 µl da amostra, totalizando 30 µl. As condições da reação de PCR incluem uma etapa inicial de desnaturação de 95 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s). Para analisar os resultados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, posteriormente corado por prata (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.6 PCR em tempo real

O PCR em tempo real do gene *lipL32* foi realizado para comparar e confirmar a sensibilidade do ensaio LAMP. Uma curva de diluição em 4x foi realizada a partir do ponto 2×10^6 células/ml de forma a avaliar o limite de detecção bacteriana pela técnica. Posteriormente, foi realizado um ensaio *Probit* com três repetições. Além disso, qPCR foi realizado também com as amostras dos cultivos de diferentes cepas bem como as amostras clínicas utilizadas nesse estudo. *Primers* e sondas utilizados foram descritos previamente (HAMOND et al., 2015). As concentrações de *primers* foram determinadas segundo protocolo padrão da empresa Simbios Biotecnologia Ltda. O protocolo consiste em incubação inicial de 95 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s).

4.7 LAMP

O LAMP foi realizado com três genes alvo diferentes: *LIC13162*, *LIC20239* e *lipL32*. As tentativas de padronização da técnica foram feitas com diferentes variações de tempo (30 minutos e 60 minutos) e unidade de enzima *Bst* por reação (2U/reação, 4U/reação e 8U/reação). Um controle positivo de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 com 2×10^8 células/ml (contagem de células feita em câmara de Petroff-Hausser) foi diluído seriadamente em 10x para os testes.

A confirmação da amplificação dos genes alvo foi avaliada através de incubação dos produtos do LAMP com enzimas de restrição específicas para as

sequências dos genes alvos; *AluI* para *lipL32*, *HinfI* e *BstNI* para LIC20239, e *HinfI* e *HhaI* para LIC13162.

A técnica foi realizada com reações de 25 µl, contendo Mastermix e *Bst* polimerase. A incubação foi feita em termociclador à 60 °C por 60 min e para a inativação à 80° C por 5 min. Para analisar os resultados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, posteriormente corado por prata (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.8 Desempenho analítico (Sensibilidade e especificidade)

O DNA extraído de cultivo de *L. interrogans* cepa FioCruz L1-130 contendo 2×10^8 células/ml foi diluído 10X de forma seriada partindo desta concentração. A curva de DNA gerou pontos de 2×10^7 até 2×10^2 . A partir do ponto 2×10^6 foi feita uma nova diluição 4X, usada para o ensaio de sensibilidade *probit*, no qual foi feito em três repetições.

Para o teste de especificidade, foi utilizado o DNA extraído de leptospiros patogênicas, *L. biflexa* (saprófita) e de outras culturas bacterianas como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marscencens* e *Mycobacterium tuberculosis*.

4.9 Performance diagnóstica

As amostras clínicas foram submetidas à uma segunda análise por qPCR, para a confirmação de amostras positivas e negativas. Posteriormente, foi feita análise das amostras pela técnica de LAMP, com finalidade de avaliar o teste diagnóstico.

4.10 Análise estatística

O cálculo estatístico PROBIT dos ensaios foi realizado através do *software* SPSS® Statistics e a performance diagnóstica calculada através das seguintes fórmulas:

Sensibilidade = $\text{Positivos verdadeiros} \div (\text{Positivos Verdadeiros} + \text{Falsos Negativos})$

Especificidade = $\text{Negativos Verdadeiros} \div (\text{Negativos Verdadeiros} + \text{Falsos Positivos})$

Eficiência (acurácia) = $(\text{Positivos Verdadeiros} + \text{Negativos Verdadeiros}) \div N \text{ total}$

Índice *kappa* (concordância) = $P_o - P_e \div 1 - P_e$, sendo:

P_o = Proporção de concordâncias observadas

P_e = Proporção de concordâncias esperadas

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de genes alvo

A análise comparativa de genomas de 20 espécies de *Leptospira*, englobando 14 espécies patogênicas ou intermediárias (patogênicas oportunistas) e 6 saprófitas (FOUTS et al., 2016) permitiu a identificação de dois genes alvo potenciais para detecção de leptospiros patogênicos: LIC13162 (atividade de transferase, UNIPROT entrada: Q72MN1) e LIC20239 (atividade catalisadora adenosilmetionina decarboxilase, UNIPROT entrada: Q75FF4). Adicionalmente, foi selecionado o gene *lipL32*, pois constitui atualmente no principal alvo genético de cepas patogênicas de *Leptospira*.

Os conjuntos de *primers* para dois ensaios de LAMP independentes (tendo como alvo LIC13162 e LIC20239) foram desenhados e adquiridos (Tabela 2).

5.2 Implementação dos procedimentos de amplificação

Os procedimentos de PCR foram implementados com a utilização de DNAs de 13 cepas de *Leptospira* (*L. interrogans* Copenhageni, *L. interrogans* Pomona, *L. interrogans* Australis sorovar Bratislava, *L. interrogans* Sejroe sorovar Wolffi, *L. borgpetersenii* sorovar Tarasovi, *L. interrogans* cepa Hardjoprajitno, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae, *L. biflexa* Patoc, *L. interrogans* L1-130, *L. kirschnerii* Mozdok, *L. borgpetersenii* Sejroe sorovar Hardjobovis, *L. interrogans* Canicola e *L. kirschnerii* Gryppotyphosa), sendo 12 patogênicas e 1 saprófita.

Os procedimentos de PCR para ambos os genes alvo apresentaram amplificação visível em gel de poliacrilamida, sendo que o *amplicon* correspondeu aos fragmentos de 85 pb referente ao gene LIC13162 (Figura 3) e 93 pb referente ao gene LIC20239 (Figura 4).

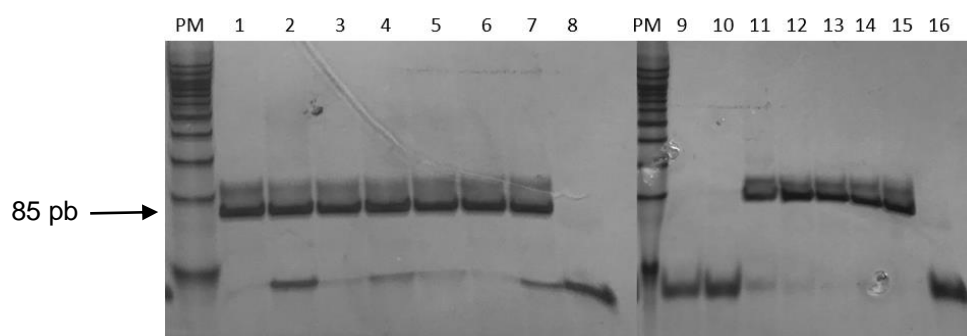


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de *Leptospira* para o gene LIC13162 (PCR). PM – Marcador de peso molecular; 1, *L. interrogans* Coepenhageni; 2, *L. interrogans* Pomona; 3, *L. interrogans* Australis sorovar Bratislava; 4, *L. interrogans* Sejroe sorovar Wolffi; 5, *L. borgpetersenii* sorovar Tarasovi; 6, *L. interrogans* Hardjoprajitno; 7, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 8, Controle negativo; 9, *L. biflexa* Patoc; 10, Controle negativo; 11, *L. interrogans* L1130; 12, *L. kirschnerii* Mozdok; 13, *L. borgpetersenii* Sejroe sorovar Hardjobovis; 14, *L. interrogans* Canicola; 15, *L. kirschnerii* Gryppotyphosa; 16, Controle negativo.

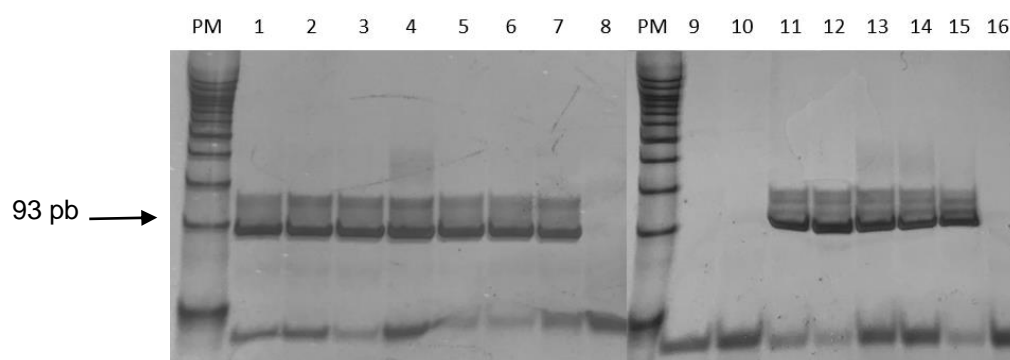


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de *Leptospira* para o gene LIC20239 (PCR). PM – Marcador de peso molecular; 1, *L. interrogans* Coepenhageni; 2, *L. interrogans* Pomona; 3, *L. interrogans* Australis sorovar Bratislava; 4, *L. interrogans* Sejroe sorovar Wolffi; 5, *L. borgpetersenii* sorovar Tarasovi; 6, *L. interrogans* Hardjoprajitno; 7, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 8, Controle negativo; 9, *L. biflexa* Patoc; 10, Controle negativo; 11, *L. interrogans* L1130; 12, *L. kirschnerii* Mozdok; 13, *L. borgpetersenii* Sejroe sorovar Hardjobovis; 14, *L. interrogans* Canicola; 15, *L. kirschnerii* Gryppotyphosa; 16, Controle negativo.

Os procedimentos de LAMP para *lipL32*, LIC13162 e LIC20239 foram realizados com amostra da *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 em diferentes tempos (30 e 60 minutos) e concentrações de enzima (2U, 4U e 8U/reação).

A Figura 5 apresenta os resultados de *lipL32*, onde ocorreu efetiva amplificação da amostra e diluições decimais com 30 minutos de duração, temperatura de 65 °C e concentração de enzima *Bst* 2.0 de 4U/reação. Observa-se nos poços 1, 2 e 3 o

padrão de bandas característico da amplificação do LAMP. Os fragmentos do gene *lipL32* nos tamanhos esperados de 115/73 pb foram confirmados com digestão pela enzima *AluI*.

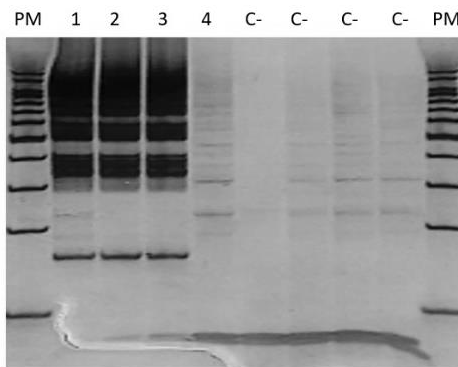


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP com o gene *lipL32*. PM - Peso Molecular; 1, controle positivo diluído 10x; 2, controle positivo diluído 100x; 3, controle positivo diluído 1000x; 4, controle positivo diluído 10000x; C-, controle negativo

Já a padronização das reações de LAMP das regiões LIC13162 (Figuras 6 e 7) e LIC20239 (Figuras 8, 9) não foi possível em nenhuma das variações, ou seja, (1) tempo de reação e/ou (2) concentração de enzima. Observa-se que o tempo de 60 minutos de reação não permite diferenciar as amplificações dos controles positivos em relação aos controles negativos, enquanto na reação de 30 minutos, nenhum fragmento amplificado é observado no gel. As diferentes concentrações de enzima também não apresentaram diferença na amplificação. A digestão com enzimas de restrição dos produtos de LAMP tanto do gene LIC13162 quanto do LIC20239 não demonstrou bandas compatíveis com produtos específicos, afirmando que o padrão de bandas apresentado no gel é resultante de amplificações inespecíficas.

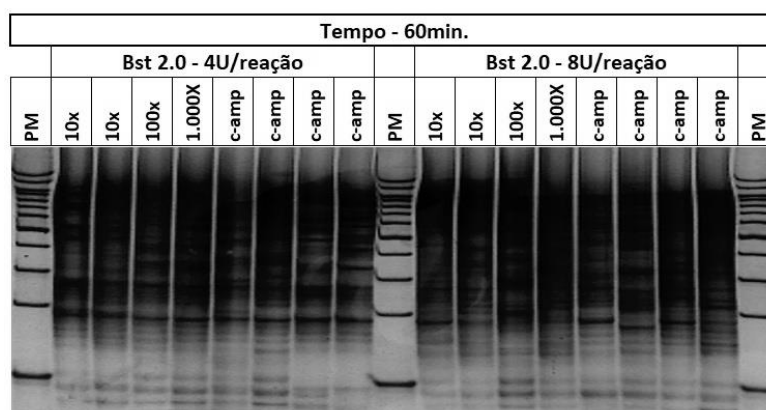


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene LIC13162, com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação

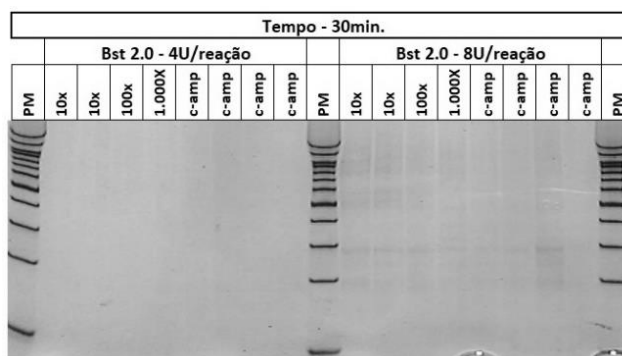


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 30 minutos do gene LIC13162, com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação

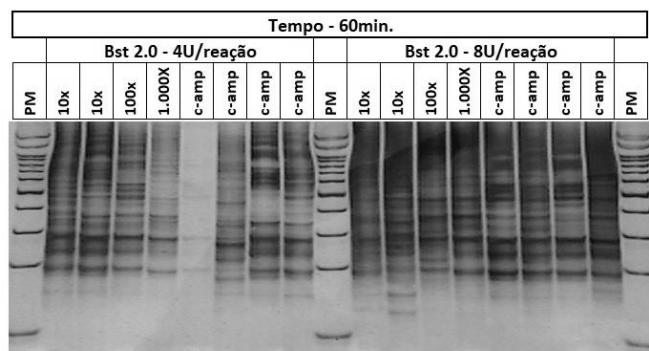


Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene LIC20239 (primeiro conjunto de primers), com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação

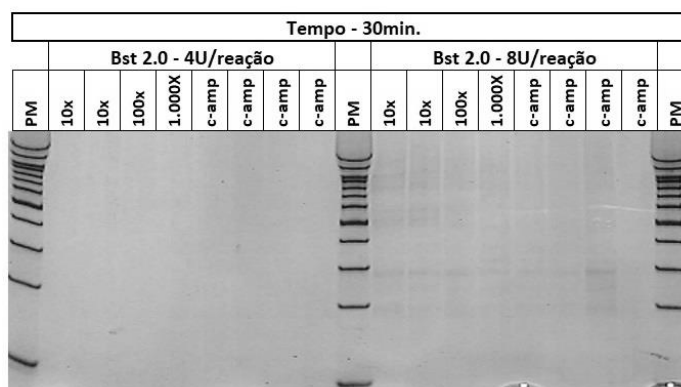


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 30 minutos do gene LIC20239 (primeiro conjunto de primers), com as concentrações de enzima 4 U e 8 U/reação.

Devido à ineficiência na amplificação usando os conjuntos de *primers* demonstrados, uma nova tentativa de desenho de *primers* foi realizada, tentando aumentar a estringência e deixando a temperatura de anelamento / estabilidade mais próxima à temperatura de reação. Além disso, foi adicionada uma sequência espaçadora composta por quatro nucleotídeos (TTTT) entre os *primers* F1c e F2, conforme descrito previamente (Yang et al., 2018; Zhang et al., 2012). Porém, os resultados foram os mesmos, não sendo obtidas amplificações específicas com esses novos conjuntos de *primers* (Figura 10).

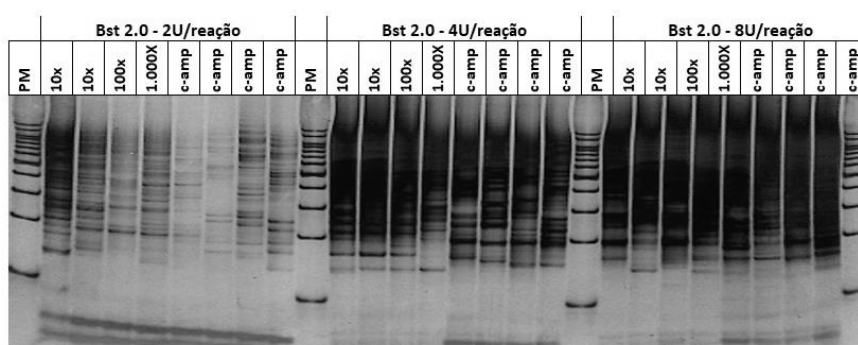


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida da reação de LAMP de 60 minutos do gene LIC20239 (segundo conjunto de primers), com as concentrações de enzima 2 U, 4 U e 8 U/reação

5.3 Avaliação da performance analítica do LAMP

Tendo em vista que o LAMP com *lipL32* apresentou os melhores resultados na amplificação, o desempenho analítico e a performance diagnóstica foram avaliados somente nesse sistema.

A análise de sensibilidade do LAMP foi realizada comparativamente com o PCR em tempo real, utilizando o controle de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 em uma diluição seriada de 4 vezes partindo do ponto 2×10^6 células/ml. Os resultados demonstraram que as técnicas de PCR e LAMP apresentaram o mesmo limite de detecção (156 células/ μ l) considerando uma abordagem mais conservadora, ou seja, com positividade em todas as três repetições (Tabela 4).

Tabela 4. Ensaio *probit* com três repetições (qPCR vs LAMP)

CEL/ μ l	qPCR n(%)	LAMP n(%)
10000	3 (100)	3 (100)
2500	3 (100)	3 (100)
625	3 (100)	3 (100)
156	3 (100)	3 (100)
39	2 (67)	1 (33)
10	0	0
2	1 (33)	1 (33)

Além disso, foi realizada uma análise estatística com o cálculo do PROBIT a partir de uma avaliação dos resultados de todas as diluições e todas as repetições. A sensibilidade analítica do qPCR foi de 16,5 células/ μ l considerando uma probabilidade de detecção de 50% das amostras com essa concentração e de 282 células/ μ l para uma probabilidade de detecção de 95% das amostras com essa mesma concentração. Já a sensibilidade analítica do LAMP foi de 25,7 células/ μ l considerando uma probabilidade de detecção de 50% das amostras com essa concentração e de 562 células/ μ l para uma probabilidade de detecção de 95% das amostras com essa mesma concentração (Tabela 5).

Tabela 5. Cálculo de sensibilidade analítica PROBIT (qPCR vs LAMP)

	qPCR cel/μl (log)	LAMP cel/μl (log)
0,5	16,5 (1,22)	25,7 (1,4)
0,95	282 (2,45)	562 (2,75)

A análise de especificidade analítica foi realizada com a avaliação de 14 isolados de *Leptospira*, 13 patogênicas e 1 saprófita. O LAMP *lipL32* demonstrou amplificação no padrão de bandas esperado, diferenciando-se da espécie saprófita *L. biflexa* cepa Patoc (Figura 11) e de outras espécies bacterianas testadas.

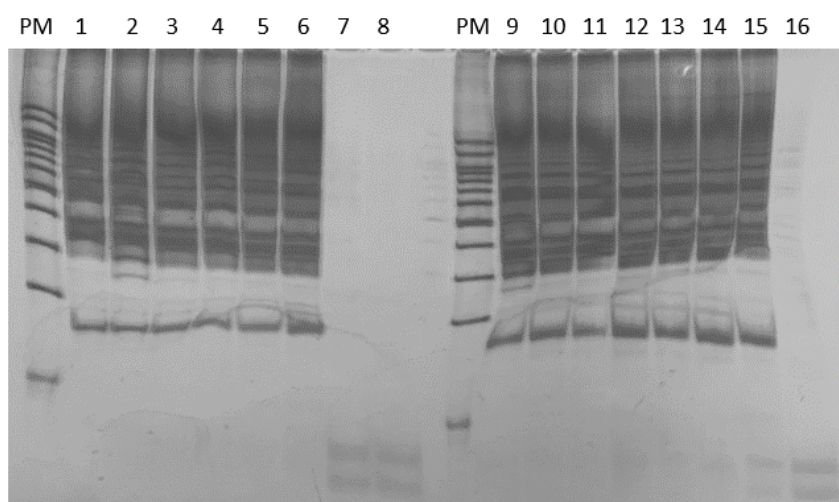


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de *Leptospira* para LAMP *lipL32*. PM – Marcador de peso molecular; 1, *L. kirshneri* cepa Mozdok; 2, *L. borgpetersenii* Tarassovi; 3, *L. interrogans* Copenhageni; 4, *L. interrogans* Pomona; 5, *L. interrogans* Bratislava; 6, *L. interrogans* Wolffi; 7, *L. biflexa* cepa Patoc; 8, Controle negativo; 9, *L. kirshneri* Gryppotyphosa; 10, *L. borgpetersenii* Hardjobovis; 11, *L. interrogans* cepa Hardjoprajitno; 12, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 13, *L. interrogans* Canicola; 14, *L. santarosii* Shermani; 15, *L. noguchii* Panama; 16, Controle negativo.

5.4 Performance diagnóstica

As amostras de tecido renal, que haviam sido previamente avaliadas pela cultura bacteriana e PCR em tempo real no Laboratório de Vacinologia (Lab7), foram submetidas a um novo qPCR e amplificação por LAMP. A performance diagnóstica foi avaliada a partir da análise comparativa desses resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Comparação dos testes diagnósticos para o alvo *lipL32*

		qPCR	
		+	-
LAMP	+	16	3
	-	3	41
Sensibilidade		0,84	
Especificidade		0,93	

Dentre as amostras avaliadas pelos testes, pode-se observar a presença de 3 casos discordantes foram positivos no qPCR e negativos no LAMP e 3 amostras discordantes que apresentaram resultado positivo no LAMP e negativo no qPCR. Os resultados obtidos demonstraram uma sensibilidade de 84,2% e especificidade de 93,2%. O valor da acurácia foi de 90% e o índice *kappa* de 76%, indicando concordância BOA, segundo escala Landis & Koch, 1977.

6 DISCUSSÃO

A leptospirose é frequentemente diagnosticada de forma tardia, devido ao seu amplo espectro de sintomas que mimetizam as apresentações clínicas de diversas outras doenças febris (Bourhy et al., 2011). Além disso, o diagnóstico direto pode ser desafiador, já que a cultura de *Leptospira* requer semanas. Os testes indiretos, como MAT e ELISA, são mais rápidos, mas detectam a presença de anticorpos e necessitam que ocorra a soroconversão no indivíduo infectado. Técnicas moleculares (como PCR) são muito úteis para o diagnóstico precoce, porém não são amplamente estabelecidas na rotina devido a complexidade do sistema analítico e a necessidade de equipamentos sofisticados para execução laboratorial (Li et al., 2018). O LAMP é uma técnica relativamente nova que tem sido usada em diversos campos das ciências biológicas, apresentando potencial de ser usada como um ensaio de diagnóstico simples devido à sua velocidade de reação, robustez e baixo custo (Ohtsuka et al., 2005).

No presente estudo, dois novos genes específicos foram identificados, LIC13162 e LIC20239, os quais podem ser utilizados para identificação de leptospiros patogênicas. Dessa forma, dois conjuntos de *primers* foram desenhados para ensaios de PCR convencional. Os resultados demonstraram a presença de ambos os genes em 12 cepas de leptospiros patogênicas, e a ausência de ambos em uma cepa de *Leptospira* saprófita, demonstrando a possibilidade de utilização desses alvos para ensaios de LAMP. Assim como NODA et al. (2014) e AHMED et al. (2009), que desenvolveram testes moleculares baseados em genes que permitem identificação de leptospiros patogênicas, a descoberta de LIC13162 e LIC20239 demonstra outras opções capazes de serem alvos para testes de detecção dessas bactérias. A perspectiva é que testes de PCR em tempo real possam ser desenvolvidos utilizando esses genes como alvo.

Entretanto, os conjuntos de *primers* LAMP desenhados para amplificar os genes LIC13162 e LIC20239 não apresentaram resultados de amplificação específica de leptospiros nos ensaios de implementação. Os resultados demonstraram a ocorrência de bandas inespecíficas ou ausência de bandas, em ambos os genes. Uma reação de 60 minutos resultou em amplificação tanto dos controles positivos quanto dos controles negativos, não sendo possível distinguir entre eles. Quando testada a mesma reação por 30 minutos, nenhuma amplificação apareceu no gel. As alterações

nas concentrações de enzima também não permitiram a obtenção de bandas específicas e amplificação apenas das amostras com DNA específico de *Leptospira*. Todos os *primers* do presente estudo foram definidos utilizando o Primer Explorer (Eiken, Japão), *software* comercial recomendado para essa finalidade. Entretanto, as interações entre os *primers*, as sequências alvo e não-alvos, e os *amplicons* são difíceis de prever apenas em uma análise *in silico* (Hardinge & Murray, 2019).

Um dos desafios do LAMP é a escolha de um alvo genético apropriado para amplificação, seja esse uma região altamente conservada ou um sítio específico de uma cepa em particular de um determinado microrganismo. O LAMP utiliza de quatro a seis *primers*, necessitando entre seis a oito regiões dentro de um pequeno fragmento na sequência alvo. Portanto, o design dos *primers* está condicionado a uma série de restrições e pode ser bastante difícil. Apesar de existirem *softwares* disponíveis, existem circunstâncias nas quais os sítios escolhidos não conseguem ser selecionados, restando como opção o desenho manual de *primers* (Wong et al., 2018).

Outra característica intrínseca do LAMP é o uso de múltiplos *primers*, o que pode aumentar a chance de hibridização entre os próprios *primers* (Gao et al., 2019; Watts et al., 2014). Além disso, aumenta a possibilidade de ligação destes em outras regiões do genoma com sequências parecidas, favorecendo as amplificações inespecíficas. Essas situações podem explicar a dificuldade adicional no desenvolvimento de um ensaio de LAMP, diferentemente do PCR que utiliza normalmente dois *primers*. Estudos prévios de desenvolvimento e validação de técnicas de LAMP reportaram dificuldade em acertar o desenho de um conjunto de *primers* (Kollenda et al., 2018; Das et al., 2012), devido a dificuldade de prever a reação *in silico* ou mesmo ocorrência de amplificações cruzadas (Hansen et al., 2016).

Neste trabalho, uma segunda tentativa de desenho de *primers* foi realizada para o gene *LIC20269*, onde os parâmetros de temperatura de anelamento e estabilidade foram re-analisados, visando à temperatura ideal e com o mínimo de alterações manuais possíveis. Ainda assim, não foi possível conseguir amplificações específicas, indicando que selecionar *primers* para LAMP com a temperatura de anelamento dentro dos padrões recomendados ainda não é suficiente para assegurar uma adequada performance da reação (Khorosheva et al., 2016).

Além dos novos genes, também foi realizada a implementação de um procedimento de LAMP previamente estabelecido, baseado no gene *lipL32* (Hsu et al., 2017). A padronização do ensaio *lipL32* foi realizada com sucesso, com 30 minutos

e 4 U de enzima por reação, sendo possível realizar a avaliação do desempenho analítico e da performance diagnóstica.

A especificidade analítica foi determinada pela análise de LAMP de espécies e sorovares diferentes de *Leptospira*, onde as patogênicas demonstraram amplificação característica enquanto a saprófita não. Além disso, diferentes espécies bacterianas (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marscencens* e *Mycobacterium tuberculosis*) foram testadas. Em nenhuma dessas ocorreu a amplificação com o padrão de bandas do LAMP. Assim indicando que o teste é específico apenas para detecção de *Leptospira*, corroborando com os resultados encontrados por HSU et al., 2017, que além das diversas cepas de *Leptospira*, utilizou também *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus intermedius*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumonia*, *Proteus mirabilis* e *E. coli*, bem como com outros autores que desenvolveram testes LAMP para *Leptospira* com outros alvos genéticos (Monica et al., 2019; Chen et al., 2015; Ali, Kaur, Bobby, T Sabarinath, et al., 2017).

Na avaliação da sensibilidade analítica, o ensaio LAMP apresentou um limite de detecção (LOD) de 156 células/ml, enquanto o PCR em tempo real apresentou um LOD com o mesmo número de células/ml. No estudo de HSU et al., 2017, a sensibilidade analítica foi avaliada através da diluição do DNA de *Leptospira* em 10x e demonstrou amplificação com 10 cópias por reação (quantificação por Nanodrop). As diferentes formas de estimar os valores absolutos para cálculos de sensibilidade podem trazer algumas variações nos resultados. Nesse trabalho, o valor foi obtido através de contagem de células em câmara de Petroff-Hausser. Além disso, as diluições foram realizadas em 4x, trazendo dados mais precisos, que reafirmaram a alta sensibilidade do teste.

Testes de determinação da sensibilidade analítica requerem no mínimo seis repetições (Kralik et al., 2011), mas quanto maior o número de replicatas, maior é o nível de confiança do LOD (Kralik & Ricchi, 2017). Neste trabalho, visando revalidar um método previamente descrito, foram realizadas três repetições. Os dados obtidos mostram, portanto, estimativas próximas e indicam LODs bem parecidos entre os testes LAMP e qPCR. Estudos prévios apresentaram resultados similares, os quais a sensibilidade analítica do qPCR se iguala (Wang et al., 2020) ou é maior que a do LAMP (Giglioti et al., 2019; Hsu et al., 2017).

O LAMP para detecção de *Leptospiras* já vem sendo desenvolvido desde o ano de 2009, sendo o primeiro artigo publicado com o gene *lipL41* como alvo. O teste apresentou limite de detecção de 100 cópias de leptospira (Lin et al., 2009). Posteriormente, foram realizados testes para outros genes, como o 16s rRNA, o qual demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade analítica (Sonthayanon et al., 2011) e o LigB, com LOD de 150 fg (Ali, Kaur, Bobby, T Sabarinath, et al., 2017). Estudos que utilizam o *lipL32* como alvo, indicam alta sensibilidade analítica ($3,95 \times 10^{-1}$ células) (Nurul Najian et al., 2016), e ainda comparam esse alvo com o 16sRNA, que apesar deste ter demonstrado um melhor LOD, obteve taxa maior de falsos positivos, tornando o *lipL32* um alvo preferencial para detecção de leptospiras patogênicas (Gentilini et al., 2017).

Neste trabalho, a avaliação final da performance diagnóstica foi realizada com um total de 63 amostras de tecido renal de hamsters. A performance diagnóstica obtida do LAMP *lipL32* foi de 84,2% de sensibilidade e 92,3% de especificidade.

Entre as amostras clínicas analisadas, foi observado 3 casos discordantes que foram positivos no qPCR e negativos no LAMP. Porém, todas apresentavam valores de Ct superiores a 31 (31,2, 32 e 33,3), ou seja, amostras com quantidades menores de DNA de *Leptospira*. A ocorrência de falsos negativos em ensaios LAMP pode ocorrer devido ao número de micro-organismos nas amostras serem menores do que o limite de detecção do teste, ou devido à falha de anelamento de *primers* (Sonthayanon et al., 2011). Entre as 16 amostras positivas concordantes, 15 apresentaram valores de Ct (do inglês, *Cycle threshold*) menores que 31 e apenas uma com valor de 33,4.

Já na análise das outras 3 amostras discordantes, essas podem ser resultados falsos positivos. O LAMP, por ser um teste extremamente sensível, resulta em produtos de amplificação que não degradam tão facilmente, tornando o ambiente susceptível à transições não-intencionais de *amplicons* (Wong et al., 2018). Apesar de todas as reações terem sido feitas cuidadosamente em um ambiente estéril e analisadas em salas separadas para evitar contaminação, esses casos discordantes podem ter tido contato com produtos de amplificações anteriores.

No estudo de HSU et al. (2017), as amostras utilizadas para validar o teste da *lipL32* foram soro (32) e urina (31) de gatos aparentemente saudáveis. Foi obtida ótima performance diagnóstica, com 91,7% de sensibilidade e 100% de especificidade. Já em outros estudos avaliando diferentes alvos genéticos de

Leptospira, como por exemplo o 16S rRNA, a performance diagnóstica obtida foi 43,6% de sensibilidade e 83,5% de especificidade (Sonthayanon et al., 2011). Quando o alvo foi *lipL41*, o teste apresentou alta sensibilidade diagnóstica, porém com apenas 7 amostras clínicas analisadas para essa avaliação (Lin et al., 2009).

A técnica do PCR em tempo real necessita de no mínimo uma hora e meia para sua realização, além da necessidade de equipamentos sofisticados. Neste trabalho, a reação do LAMP *lipL32* foi padronizada em 30 min, demonstrando eficiência para detecção de leptospiros em menos da metade desse tempo. Embora outros estudos apresentem o qPCR como mais sensível que o LAMP, o alto custo do qPCR torna difícil seu uso em países em desenvolvimento (Gentilini et al., 2017; Khan et al., 2018). O LAMP *lipL32* apresentado nesse trabalho possui alta sensibilidade analítica, somado a condições mais flexíveis de reação. Portanto, o LAMP *lipL32* pode ser recomendado não apenas para países com recursos limitados, mas também para realização à campo. E principalmente, apresenta potencial de uso como um teste *point-of-care*.

No presente estudo foi desenvolvido o procedimento completo de análise do LAMP *lipL32*. O método foi desenvolvido previamente no estudo de HSU et al. (2017), o qual apresentou resultados similares de performance diagnóstica, com amostras clínicas de sangue e urina de gatos. Neste trabalho, a avaliação da performance diagnóstica da técnica foi realizada com amostras de tecido renal. Foram obtidos resultados comparáveis ao PCR em tempo real, com boa concordância e acurácia. Dessa maneira, ampliando seu uso com vários tipos de amostra. Além disso, há a perspectiva de tornar o método ainda mais rápido com ajustes na visualização do resultado com fluorescência (Li et al., 2018), turbidimetria (Mori et al., 2001) ou colorimetria (Kitamura et al., 2018), o que também contribui para diminuir a contaminação cruzada uma vez que não haverá necessidade de abertura do tubo para análise dos resultados.

7 CONCLUSÃO GERAL

- Os genes LIC13162 e LIC20239 identificados neste estudo, que até então não haviam sido descritos na literatura, demonstraram estar presentes apenas em leptospiros patogênicos;

- Os LAMP desenvolvidos para os genes LIC13162 e LIC20239 não apresentaram amplificação específica, indicando possível falta de especificidade dos *primers* desenhados utilizados;

- O gene da *lipI32* demonstrou ser um excelente alvo para detecção de leptospiros patogênicos, reafirmando seu potencial de uso para testes moleculares comerciais;

- O LAMP demonstra ter um grande potencial para aplicação como teste rápido *point-of-care*, podendo inclusive ser realizado em instalações mais simples e também à campo.

8 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J., SAFFIE, N., SJASRI, F.A.R., HUSIN, A., ABDUL-RAHMAN, Z., ISMAIL, A., AZIAH, I. & MOHAMED, M. (2014). Rapid detection of Salmonella Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140((3-4)). p. 287–296.
- AHMED, A., ENGELBERTS, M.F.M., BOER, K.R., AHMED, N. & HARTSKEERL, R.A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic Leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE*. 4(9).
- AHMED, S.A., SANDAI, D.A., MUSA, S., HOE, C.H., RIADZI, M., LAU, K.L. & TANG, T.H. (2012). Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*. 19(3). p. 9–16.
- ALI, S.A., KAUR, G., BOBY, N., SABARINATH, T., SOLANKI, K., PAL, D. & CHAUDHURI, P. (2017). Rapid and visual detection of Leptospira in urine by LigB-LAMP assay with pre-addition of dye. *Molecular and Cellular Probes*. 36. p. 29–35.
- ALI, S.A., KAUR, G., BOBY, N., SABARINATH, T., SOLANKI, K., PAL, D. & CHAUDHURI, P. (2017). Rapid and visual detection of Leptospira in urine by LigB-LAMP assay with pre-addition of dye. *Molecular and Cellular Probes*.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. (2006). Canine leptospirosis--do we have a problem? *Veterinary microbiology*. 117(1). p. 19–24.
- BAJANI, M.D., ASHFORD, D.A., BRAGG, S.L., WOODS, C.W., AYE, T., SPIEGEL, R.A., PLIKAYTIS, B.D., PERKINS, B.A., PHELAN, M., LEVETT, P.N. & WEYANT, R.S. (2003). Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(2). p. 803–809.
- BAQUERO, O.S. & MACHADO, G. (2018). Spatiotemporal dynamics and risk factors for human Leptospirosis in Brazil. *Scientific Reports*. 8(1).
- BAROCCHI, M.A., KO, A.I., GALVÃO REIS, M., McDONALD, K.L. & RILEY, L.W. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infection and Immunity*. 70(12). p. 6926–6932.
- BENTALEB, E.M., ABID, M., EL MESSAOUDI, M.D., LAKSSIR, B., RESSAMI, E.M., AMZAZI, S., SEFRIQUI, H. & AIT BENHASSOU, H. (2016). Development and evaluation of an in-house single step loop-mediated isothermal amplification (SS-LAMP) assay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum samples from Moroccan patients. *BMC Infectious Diseases*.
- BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICALDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT, M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J.M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*. 3(12). p. 757–771.
- BIRMPA, A., KALOGEROPOULOS, K., KOKKINOS, P. & VANTARAKIS, A. (2015). Evaluation of Two Loop-mediated Isothermal Amplification Methods for the Detection of

- Salmonella Enteritidis and Listeria Monocytogenes in Artificially Contaminated Ready-to-Eat Fresh Produce. *Italian journal of food safety*. 4(3). p. 5383.
- BOURHY, P., BREMONT, S., ZININI, F., GIRY, C. & PICARDEAU, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(6). p. 2154–2160.
- BOURHY, P., VRAY, M. & PICARDEAU, M. (2013). Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *Journal of medical microbiology*. 62(Pt 6). p. 822–7.
- BROWNLOW, T., KAVANAGH, O. V, LOGAN, E.F., HARTSKEERL, R.A., SAVAGE, R., PALMER, M.F., KRAHL, M., MACKIE, D.P. & ELLIS, W.A. (2014). 'Leptorapide'-a one-step assay for rapid diagnosis of human leptospirosis. *Epidemiology & Infection*.
- BUDIHAL, S.V. & PERWEZ, K. (2014). Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 8(1). p. 199–202.
- CAMERON, C.E. (2015). Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In B. Adler (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. p. 21–41.
- CHASSIN, C., PICARDEAU, M., GOUJON, J.-M., BOURHY, P., QUELLARD, N., DARCHE, S., BADELL, E., D'ANDON, M.F., WINTER, N., LACROIX-LAMANDÉ, S., BUZONI-GATEL, D., VANDEWALLE, A. & WERTS, C. (2009). TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 183(4). p. 2669–77.
- CHEN, H.-W., WEISSENBERGER, G., ATKINS, E., CHAO, C.-C., SUPUTTAMONGKOL, Y. & CHING, W.-M. (2015). Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Leptospira*. *International Journal of Bacteriology*. 2015. p. 1–6.
- CHIRIBOGA, J., BARRAGAN, V., ARROYO, G., SOSA, A., BIRDSSELL, D.N., ESPAÑA, K., MORA, A., ESPÍN, E., MEJÍA, M.E., MORALES, M., PINARGOTE, C., GONZALEZ, M., HARTSKEERL, R., KEIM, P., BRETAS, G., EISENBERG, J.N.S. & TRUEBA, G. (2015). High prevalence of intermediate leptospira spp. DNA in febrile humans from urban and rural Ecuador. *Emerging Infectious Diseases*. 21(12). p. 2141–2147.
- CONRAD, N.L., CRUZ MCBRIDE, F.W., SOUZA, J.D., SILVEIRA, M.M., FÉLIX, S., MENDONÇA, K.S., SANTOS, C.S., ATHANAZIO, D.A., MEDEIROS, M.A., REIS, M.G., DELLAGOSTIN, O.A. & MCBRIDE, A.J.A. (2017). LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis J. N. Ricaldi (ed.). *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11(3). p. E0005441.
- COSTA, F., HAGAN, J.E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZ-SILVEIRA, M.S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A.I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review P. L. C. Small (ed.). *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9(9). p. E0003898.
- CULLEN, P.A., HAAKE, D.A., BULACH, D.M., ZUERNER, R.L. & ADLER, B. (2003). LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and immunity*. 71(5). p. 2414–21.
- DAS, A., BABIUK, S. & MCINTOSH, M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *Journal of*

- Clinical Microbiology*. 50(5). p. 1613–1620.
- DEY, S., MOHAN, C.M., RAMADASS, P. & NACHIMUTHU, K. (2008). Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *The Indian journal of medical research*. 128(2). p. 172–7.
- DIVERS, T.J., CHANG, Y.F., IRBY, N.L., SMITH, J.L. & CARTER, C.N. (2019). Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Veterinary Journal*. 51(3). p. 287–292.
- ELDIN, C., JAULHAC, B., MEDIANNIKOV, O., ARZOUNI, J.-P. & RAOULT, D. (2019). Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes. *Medecine et maladies infectieuses*. 49(2). p. 102–111.
- ELLIS, W.A. (2015). Animal Leptospirosis. In Springer, Berlin, Heidelberg, p. 99–137.
- EVANGELISTA, K. V. & COBURN, J. (2010). Leptospira as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*. 5(9). p. 1413–1425.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. & PEROLAT, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis* 2nd ed., Melbourne, Australia: MediSci.
- FOUTS, D.E., MATTHIAS, M.A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D.E., BULACH, D., BUSCHIAZZO, A., CHANG, Y.-F., GALLOWAY, R.L., HAAKE, D.A., HAFT, D.H., HARTSKEERL, R., KO, A.I., LEVETT, P.N., MATSUNAGA, J., MECHALY, A.E., MONK, J.M., NASCIMENTO, A.L.T., ET AL. (2016). What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira P. L. C. Small (ed.). *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10(2). p. E0004403.
- GAO, X., SUN, B. & GUAN, Y. (2019). Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 411(6). p. 1211–1218.
- GENTILINI, F., ZANONI, R.G., ZAMBON, E. & TURBA, M.E. (2017). A comparison of the reliability of two gene targets in loop-mediated isothermal amplification assays for detecting leptospiral DNA in canine urine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(1). p. 100–104.
- GIGLIOTI, R., BASSETTO, C.C., OKINO, C.H., DE OLIVEIRA, H.N. & DE SENA OLIVEIRA, M.C. (2019). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Anaplasma marginale*. *Experimental and Applied Acarology*. 77(1). p. 65–72.
- GIRAULT, D., SOUPÉ-GILBERT, M.-E., GEROULT, S., COLOT, J. & GOARANT, C. (2017). Isolation of *Leptospira* from blood culture bottles.
- GOARANT, C. (2016). Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Research and Reports in Tropical Medicine*. Volume 7. p. 49–62.
- GOARANT, C., PICARDEAU, M., MORAND, S. & MCINTYRE, K.M. (2019). Leptospirosis under the bibliometrics radar: Evidence for a vicious circle of neglect. *Journal of Global Health*. 9(1).
- GÖKMEN, T., SOYAL, A., KALAYCI, Y., ÖNLEN, C. & KÖKSAL, F. (2016). COMPARISON OF 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR AND OmpL1-PCR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. *Rev. Inst. Med. Trop.*

Sao Paulo.

- GORIS, M.G.A., LEEFLANG, M.M.G., LODEN, M., WAGENAAR, J.F.P., KLATSER, P.R., HARTSKEERL, R.A. & BOER, K.R. (2013). Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7(7).
- GRASSMANN, A.A., FÉLIX, S.R., DOS SANTOS, C.X., AMARAL, M.G., NETO, A.C.P.S., FAGUNDES, M.Q., SEIXAS, F.K., DA SILVA, É.F., CONCEIÇÃO, F.R. & DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the b subunit of escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(5). p. 740–745.
- GUGLIELMINI, J., BOURHY, P., SCHIETTEKATTE, O., ZININI, F., BRISSE, S. & PICARDEAU, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13(4). p. E0007374.
- GURUMURTHY, K., NARASIMHA, H.B., WYAWAHARE, M. & BISWAL, N. (2018). Leptospirosis: a diagnostic conundrum. *Tropical Doctor*. 48(4). p. 306–309.
- HAAKE, D.A., CHAO, G., ZUERNER, R.L., BARNETT, J.K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P.N. & BOLIN, C.A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and immunity*. 68(4). p. 2276–85..
- HAAKE, P.N. & LEVETT, D.A. (2015). Leptospirosis in humans. In *Leptospira and Leptospirosis*.
- HAMOND, C., PESTANA, C.P., ROCHA-DE-SOUZA, C.M., CUNHA, L.E.R., BRANDÃO, F.Z., MEDEIROS, M.A. & LILENBAUM, W. (2015). Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. *Veterinary Microbiology*. 179(3–4). p. 264–269.
- HANSEN, Z.R., KNAUS, B.J., TABIMA, J.F., PRESS, C.M., JUDELSON, H.S., GRÜNWARD, N.J. & SMART, C.D. (2016). Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Microbiology*. 120(4). p. 1010–1020.
- HARDINGE, P. & MURRAY, J.A.H. (2019). Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Scientific Reports*. 9(1). p. 1–13.
- HIRAYAMA, H., KAGEYAMA, S. & MORIYASU, S. (2004). Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. . 62. p. 887–896.
- HOTEZ, P.J. (2016). Neglected Tropical Diseases in the Anthropocene: The Cases of Zika, Ebola, and Other Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(4).
- HSU, Y.H., CHOU, S.J., CHANG, C.C., PAN, M.J., YANG, W.C., LIN, C.F. & CHAN, K.W. (2017). Development and validation of a new loop-mediated isothermal amplification for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*. 141(June). p. 55–59.
- JOUGLARD, S.D.D., SIMIONATTO, S., SEIXAS, F.K., NASSI, F.L. & DELLAGOSTIN, O.A. (2006). Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic

- leptospire. *Canadian Journal of Microbiology*. 52(8). p. 747–752.
- JUNG, L.R.C., BOMFIM, M.R.Q., KROON, E.G. & NUNES, Á.C. (2015). Identification of *Leptospira* serovars by RFLP of the RNA polymerase beta subunit gene (rpoB). *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(2). p. 465–476.
- KAEPHINIT, T., CKUMDEE, J., CHANSIRI, K. & SANTIWATANAKUL, S. (2017). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification combined with a nanoprobe assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Medical Microbiology*.
- KARPAGAM, K.B. & GANESH, B. (2020). Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. p. 1–12.
- KHAN, M., WANG, R., LI, B., LIU, P., WENG, Q. & CHEN, Q. (2018). Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Frontiers in Microbiology*. 9(SEP). p. 1–11.
- KHAN, M., LI, B., JIANG, Y., WENG, Q. & CHEN, Q. (2017). Evaluation of Different PCR-Based Assays and LAMP Method for Rapid Detection of *Phytophthora infestans* by Targeting the Ypt1 Gene. *Frontiers in Microbiology*. 8. p. 1920.
- KHOROSHEVA, E.M., KARYMOV, M.A., SELCK, D.A. & ISMAGILOV, R.F. (2016). Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP. *Nucleic Acids Research*. 44(2). p. E10–e10.
- KITAMURA, M., KUBO, S., TANAKA, J. & ADACHI, T. (2018). Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay. *International Journal of Legal Medicine*. 132(4). p. 975–981.
- KO, A.I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7(10). p. 736–747.
- KOLLEND, H., HAGEN, R.M., HANKE, M., ROJAK, S., HINZ, R., WASSILL, L., POPPERT, S., TANNICH, E. & FRICKMANN, H. (2018). Poor diagnostic performance of a species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) platform for malaria. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 8(4). p. 112–118.
- KRALIK, P., SLANA, I., KRALOVA, A., BABAK, V., WHITLOCK, R.H. & PAVLIK, I. (2011). Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in faeces by quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*. 149(1–2). p. 133–138.
- KRALIK, P. & RICCHI, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*. 8(FEB). p. 1–9.
- LALL, C., VINOD KUMAR, K., VIMAL RAJ, R., VEDHAGIRI, K. & VIJAYACHARI, P. (2016). Prevalence and diversity of leptospire in different ecological niches of urban and rural areas of South Andaman Island. *Microbes and Environments*. 31(1). p. 79–89.
- LANDIS, J.R. & KOCH, G.G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 33(1). p. 159.

- LEVETT, D.A.H. AND P.N. (2015). Leptospirosis in Humans. In B. Adler (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg, p. 65–97.
- LEVETT, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 14(2). p. 296–326.
- LEVETT, P.N. & BRANCH, S.L. (2002). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66(6). p. 745–748.
- LI, C., SHI, Y., YANG, G., XIA, X., MAO, X., FANG, Y., ZHANG, A. & SONG, Y. (2018). Establishment of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. p. 131–136.
- LIANG, S.-Y., CHAN, Y.-H., HSIA, K.-T., LEE, J.-L., KUO, M.-C., HWA, K.-Y., CHAN, C.-W., CHIANG, T.-Y., CHEN, J.-S., WU, F.-T. & JI, D.-D. (2009). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(6). p. 1892–1895.
- LIN, X., CHEN, Y., LU, Y., YAN, JUYING & YAN, JIE (2009). Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 63(3). p. 237–242. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.012>.
- MAHONY, J., CHONG, S., BULIR, D., RUYTER, A., MWAWASI, K. & WALTHO, D. (2013). Development of a Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay That Provides Specimen-to-Result Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection in 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(8). p. 2696–2701.
- MARQUEZ, A., DJELOUADJI, Z., LATTARD, V. & KODJO, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 20(4). p. 184–193.
- MARTINS, G. & LILENBAUM, W. (2013). The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. *BMC veterinary research*. 9. p. 237.
- MASUZAWA, T., SAKAKIBARA, K., SAITO, M., HIDAKA, Y., VILLANUEVA, S.Y.A.M., YANAGIHARA, Y. & YOSHIDA, S.-I. (2018). Characterization of *Leptospira* species isolated from soil collected in Japan. *Microbiology and immunology*. 62(1). p. 55–59.
- MATTHIAS, M.A., RICALDI, J.N., CESPEDES, M., DIAZ, M.M., GALLOWAY, R.L., SAITO, M., STEIGERWALT, A.G., PATRA, K.P., ORE, C.V., GOTUZZO, E., GILMAN, R.H., LEVETT, P.N. & VINETZ, J.M. (2008). Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases*. 2(4). p. E213.
- MCBRIDE, A.J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G. & KO, A.I. (2005). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 18(5). p. 376–386.
- MENG, X.-L., XIE, X.-W., SHI, Y.-X., CHAI, A.-L., MA, Z.-H. & LI, B.-J. (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. *Journal of Applied Microbiology*. 122(2). p. 441–449.

- MILLER, M., ANNIS, K., LAPPIN, M. & LUNN, K. (2011). Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. (25). p. 426–432.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (2018). Ministério da Saúde do Brasil. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação*.
- MIOTTO, B.A., DA HORA, A.S., TANIWAKI, S.A., BRANDÃO, P.E., HEINEMANN, M.B. & HAGIWARA, M.K. (2017). Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipL32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(3). p. 584–590.
- MOLYNEUX, D.H., SAVIOLI, L. & ENGELS, D. (2017). Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *The Lancet*. 389(10066). p. 312–325.
- MONAHAN, A.M., CALLANAN, J.J. & NALLY, J.E. (2009). Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Veterinary Pathology*. 46(5). p. 792–799.
- MONICA, N.I., RATHINASABAPATHI, P. & RAMYA, M. (2019). Development of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) method for sensitive and rapid detection of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira*. *Letters in applied microbiology*. 68(2). p. 196–203.
- MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N. & NOTOMI, T. (2001). Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289(1). p. 150–154.
- MORI, Y. & NOTOMI, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 15(2). p. 62–69.
- MURRAY, G.L. (2015a). The molecular basis of leptospiral pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387. p. 139–185.
- MURRAY, G.L. (2015b). The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In B. Adler (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg, p. 139–185.
- MUTALIP, M.H.A., MAHMUD, M.A.F., LODZ, N.A., YOEP, N., MUHAMMAD, E.N., AHMAD, A., HASHIM, M.H. & MUHAMAD, N.A. (2019). Environmental risk factors of leptospirosis in urban settings: A systematic review protocol. *BMJ Open*. 9(1).
- MWACHUI, M.A., CRUMP, L., HARTSKEERL, R., ZINSSTAG, J. & HATTENDORF, J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS neglected tropical diseases*. 9(9). p. E0003843.
- NAGAMINE, K., HASE, T. & NOTOMI, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*. 16(3). p. 223–9.
- NAHORI, M.-A., FOURNIÉ-AMAZOUZ, E., QUE-GEWIRTH, N.S., BALLOY, V., CHIGNARD, M., RAETZ, C.R.H., SAINT GIRONS, I. & WERTS, C. (2005). Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *Journal*

- of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 175(9). p. 6022–31.
- NAKANO, R., NAKANO, A., ISHII, Y., UBAGAI, T., KIKUCHI-UEDA, T., KIKUCHI, H., TANSHO-NAGAKAWA, S., KAMOSHIDA, G., MU, X. & ONO, Y. (2014). Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Infection and Chemotherapy*.
- NIESSEN, L. (2015). Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(2). p. 553–574.
- NODA, A.A., RODRÍGUEZ, I., RODRÍGUEZ, Y., GOVÍN, A., FERNÁNDEZ, C. & OBREGÓN, A.M. (2014). High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 56(5). p. 411–5.
- NOTOMI, T., MORI, Y., TOMITA, N. & KANDA, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle , features , and future prospects. . 53(1). p. 1–5.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. & HASE, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 28(12). p. E63.
- NURUL NAJIAN, A.B., ENSKU NUR SYAFIRAH, E.A.R., ISMAIL, N., MOHAMED, M. & YEAN, C.Y. (2016). Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Analytica Chimica Acta*. 903(May 2015). p. 142–148.
- OHTSUKA, K., YANAGAWA, K., TAKATORI, K. & HARA-KUDO, Y. (2005). Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11). p. 6730–6735.
- OLIVEIRA, K.G. DE (2016). *Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner*. Universidade Federal de Goiás.
- OLIVEIRA, T.L., RIZZI, C., DA CUNHA, C.E.P., DORNELES, J., SEIXAS NETO, A.C.P., AMARAL, M.G., HARTWIG, D.D. & DELLAGOSTIN, O.A. (2019). Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. *Vaccine*. 37(6). p. 776–782.
- PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., SIOZOPOULOU, V., CHRISTOU, L. & AKRITIDIS, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases*. 12(4). p. 351–357.
- PICARDEAU, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 43(1). p. 1–9.
- PICARDEAU, M., BULACH, D.M., BOUCHIER, C., ZUERNER, R.L., ZIDANE, N., WILSON, P.J., CRENO, S., KUCZEK, E.S., BOMMEZZADRI, S., DAVIS, J.C., MCGRATH, A., JOHNSON, M.J., BOURSAUX-EUDE, C., SEEMANN, T., ROUY, Z., COPPEL, R.L., ROOD, J.I., LAJUS, A., DAVIES, J.K., ET AL. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis D. Davis (ed.). *PLoS ONE*. 3(2). p. E1607.
- PICARDEAU, M. (2015). Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging

Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(9).

- PICARDEAU, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*. 15(5). p. 297–307.
- DEL REAL, G., SEGERS, R.P., VAN DER ZEIJST, B.A. & GAASTRA, W. (1989). Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infection and immunity*. 57(8). p. 2588–90.
- RIEDIGER, I.N., STODDARD, R.A., RIBEIRO, G.S., NAKATANI, S.M., MOREIRA, S.D.R., SKRABA, I., BIONDO, A.W., REIS, M.G., HOFFMASTER, A.R., VINETZ, J.M., KO, A.I. & WUNDER, E.A. (2017). Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay T. Lin (ed.). *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11(9). p. E0005940.
- SANTOS, A.C. DOS (2011). *DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEPTOSPIROSE: BENEFÍCIO DE AMOSTRA AGUDA TARDIA NA CONFIRMAÇÃO DE CASOS*. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.
- SEAPI-RS (2018). Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural.
- SEENICHAMY, A., BAHAMAN, A.R., MUTALIB, A.R. & KHAIRANI-BEJO, S. (2014). Production and Characterization of a Polyclonal Antibody of Anti-rLipL21-IgG against *Leptospira* for Early Detection of Acute Leptospirosis. *BioMed Research International*. 2014. p. 1–8.
- SENGUPTA, M., PRABHAKAR, A.P., SATYENDRA, S., THAMBU, D., ABRAHAM, O., BALAJI, V., CHEN, H.-W., CHAO, C.-C., CHING, W.-M. & PRAKASH, J.J. (2017). Utility of loop-mediated isothermal amplification assay, polymerase chain reaction, and elisa for diagnosis of leptospirosis in South Indian patients. *Journal of Global Infectious Diseases*. 9(1). p. 3.
- SHIRATO, K. (2019). Detecting Amplicons of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Microbiology and Immunology*. p. 1348–0421.12734.
- SI AMMOUR, M., BILODEAU, G.J., TREMBLAY, D.M., VAN DER HEYDEN, H., YASEEN, T., VARVARO, L. & CARISSE, O. (2017). Development of Real-Time Isothermal Amplification Assays for On-Site Detection of *Phytophthora infestans* in Potato Leaves. *Plant Disease*. 101(7). p. 1269–1277.
- SONTHAYANON, P., CHIERAKUL, W., WUTHIEKANUN, V., THAIPADUNGPANIT, J., KALAMBAHETI, T., BOONSILP, S., AMORNCHAI, P., SMYTHE, L.D., LIMMATHUROTSAKUL, D., DAY, N.P. & PEACOCK, S.J. (2011). Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(4). p. 614–620.
- STODDARD, R.A., GEE, J.E., WILKINS, P.P., MCCAUSTLAND, K. & HOFFMASTER, A.R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 64(3). p. 247–55.
- THIBEAUX, R., IRAOLA, G., FERRÉS, I., BIERQUE, E., GIRAULT, D., SOUPÉ-GILBERT, M.-E., PICARDEAU, M. & GOARANT, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*. 4(1).
- TOMA, C., OKURA, N., TAKAYAMA, C. & SUZUKI, T. (2011). Characteristic features of

- intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cellular microbiology*. 13(11). p. 1783–92.
- TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H. & NOTOMI, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 3(5). p. 877–882.
- TOYOKAWA, T., OHNISHI, M. & KOIZUMI, N. (2011). Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 9(1). p. 111–121.
- TSUBOI, M., KOIZUMI, N., HAYAKAWA, K., KANAGAWA, S., OHMAGARI, N. & KATO, Y. (2017). Imported *Leptospira licerasiae* Infection in Traveler Returning to Japan from Brazil. *Emerging infectious diseases*. 23(3). p. 548–549.
- TUBALINAL, G.A.S.P., BALBIN, M.M., VILLANUEVA, M.A., DOMINGO, C.Y.J. & MINGALA, C.N. (2018). Evaluation of LAMP for detection and/or screening of *Leptospira* spp. infection among domestic animals in the Philippines. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 5(4). p. 459–465.
- VIJAYACHARI, P. (2007). *Leptospirosis: Laboratory Manual ICMR WHO*,
- VILLUMSEN, S., PEDERSEN, R., BORRE, M.B., AHRENS, P., JENSEN, J.S. & KROGFELT, K.A. (2012). Novel TaqMan PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *Journal of Microbiological Methods*. 91(1). p. 184–190.
- VINCENT, A.T., SCHIETTEKATTE, O., GOARANT, C., NEELA, V.K., BERNET, E., THIBEAUX, R., ISMAIL, N., KHALID, M.K.N.M., AMRAN, F., MASUZAWA, T., NAKAO, R., KORBA, A.A., BOURHY, P., VEYRIER, F.J. & PICARDEAU, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 13(5).
- VIRIYAKOSOL, S., MATTHIAS, M.A., SWANCUTT, M.A., KIRKLAND, T.N. & VINETZ, J.M. (2006). Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infection and immunity*. 74(2). p. 887–95.
- WANG, D., YU, J., WANG, Y., ZHANG, M., LI, P., LIU, M. & LIU, Y. (2020). Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *Journal of Virological Methods*. 276. p. 113775.
- WATTS, M.R., JAMES, G., SULTANA, Y., GINN, A.N., OUTHRED, A.C., KONG, F., VERWEIJ, J.J., IREDELL, J.R., CHEN, S.C.A. & LEE, R. (2014). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 90(2). p. 306–311.
- WERTS, C. (2010). Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung medical journal*. 33(6). p. 591–601.
- WHO (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. p. iii.
- WONG, Y.P., OTHMAN, S., LAU, Y.L., RADU, S. & CHEE, H.Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 124(3). p. 626–643.

- WUNDER, E.A., FIGUEIRA, C.P., SANTOS, G.R., LOURDAULT, K., MATTHIAS, M.A., VINETZ, J.M., RAMOS, E., HAAKE, D.A., PICARDEAU, M., DOS REIS, M.G. & KO, A.I. (2016). Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters G. H. Palmer (ed.). *Infection and Immunity*. 84(7). p. 2105–2115.
- XIAO, G., YI, Y., CHE, R., ZHANG, Q., IMRAN, M., KHAN, A., YAN, J. & LIN, X. (2019). Characterization of CRISPR-Cas systems in *Leptospira* reveals potential application of CRISPR in genotyping of *Leptospira interrogans*. *APMIS*. 127(4). p. 202–216.
- YANG, J.-L., MA, G. -P., YANG, R., YANG, S.-Q., FU, L.-Z., CHENG, A.-C., WANG, M.-S., ZHANG, S.-H., SHEN, K.-F., JIA, R.-Y., DENG, S.-X. & XU, Z.-Y. (2010). Simple and rapid detection of *Salmonella* serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Applied Microbiology*. 109(5). p. NO-NO.
- YANG, Q., DOMESLE, K.J. & GE, B. (2018). Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne pathogens and disease*.
- YE, L., LI, Y., ZHAO, J., ZHANG, Z., MENG, H., YAN, H., MIYOSHI, S.I. & SHI, L. (2015). Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*.
- YERSIN, C., BOVET, P., SMITS, H.L. & PEROLAT, P. (1999). Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. *Tropical Medicine and International Health*. 4(1). p. 38–45.
- ZATTI, M. DA S. (2016). *Métodos de amplificação isotérmica e algumas aplicações*.
- ZHANG, L., PAN, Z. MING, GENG, S. ZHONG, CHEN, X., LIU, Z.Y., ZHAO, F. & JIAO, X. AN (2012). A loop-mediated isothermal amplification method targets the *HisJ* gene for the detection of foodborne *Salmonella*. *European Food Research and Technology*. 234(6). p. 1055–1062.

9 ANEXOS

Anexo A – Alinhamento de sequências de leptospiros patogênicas e *primers* do LAMP (LIC13162)

Legendas:

AMARELO – nucleotídeos alinhados

VERDE – nucleotídeos alinhados

VERMELHO – *mismatches*

AZUL ESCURO – sequência do *primer*

AZUL CLARO – nucleotídeo para adicionar ao *primer*

ROSA – sequência utilizada no alinhamento

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

B3 ----- 15
Flc ----- 0
LF ----- 0
B2 ----- 0
LEP1GSC103_RS07370:borgpetersenii CAAACTTATGAGCAAACTTTGACGATCGCAAAA CAAGCGGTGACTTGGGAAAAAATAC 420
LEP1GSC048_RS04995:santarosai CAAACCTACGAACAACTTTGACGATCGCAAAA CAAGCGGTGACTTGGTAAGAAATAC 420
LEP1GSC052_3910:tmetyi CAAACCTACGAACAACTTTGACGATCGCAAAA CAAGCGGTGCAACTTGGTAAGAAATAC 420
LEP1GSC086_RS01765:weilii CAAACCTACGAGCAAACTTTGACGATCGCAAAA CAAGCGGTGCAACTGGGAAAGAAATAC 420
LEP1GSC193_RS00610:alstonii CAAACATACGAACAAACGTTGACGATCGCGAAA CAAGCGGTGAACTGGGAAAAAATAC 420
LEP1GSC062_RS02165:alexanderi CAAACCTATGAACAACTTTGACGATCGCAAAA CAAGCGGTGACTGGGAAAAAATAC 420
LEP1GSC049_4098:kirschneri CAAACCTATGAACAACTCTAACAATTGCAAAA CAAGCGGTGAACTGGGAAAAAATAC 420
LEP1GSC059_RS02910:noguchii CAAACCTATGAACAACTCTAACGATCGCAAAA CAAGCGGTGAAAGTGGGAAAAAATAC 420
B1c ----- 0
F2 ----- 0
F3 ----- 20
LIC_13162:interrogans CAAACCTATGAACAACTCTAACGATCGCAAAA CAAGCGGTGCAACTTGGTAAAAAATAC 420

```

```

B3 ----- 15
Flc ----- 0
LF ----- 0
B2 ----- 0
LEP1GSC103_RS07370:borgpetersenii AATATCTTAGA TAGAATCATCTTTTCGGGGGGGGCTTTTAAACCTCGTACTCGTCCGACC 480
LEP1GSC048_RS04995:santarosai GGTATTTTAGA TAGAATCAT TTTTCGGGGGGGAGCTTTCAAACCTCGTACTCGTCCGACC 480
LEP1GSC052_3910:tmetyi AACATCTTAGA TAGAATCATCTTTTCGGGGGGGGCTTTTAAACCTCGTACTCGTCCGACC 480
LEP1GSC086_RS01765:weilii GATATCTTAGA TAGAATCATCTTTCGGGGTGGAGCTTCAAACCCGCACGCGTCCGACC 480

```

LEP1GSC193_RS00610:alstonii	AATATTTTAGA	TGAATTATCTTTTCGAGGCGGGCG	GTTCAAACCTCGCACTCGTC	CTACC	480
LEP1GSC062_RS02165:alexanderi	AATATCTTAGA	TAGAATCATCTTTTCGAGGCGGAGC	TTTAAACCTCGCACTCGTC	CTACC	480
LEP1GSC049_4098:kirschneri	AACATTTTAGA	TAGAATCATCTTTTCGAGGCGGAGC	TTTAAACCTCGTACTCGTC	CGACC	480
LEP1GSC059_RS02910:noguchii	AATATTTTAGA	TAGAATCATCTTTTCGAGGTGGAGC	TTTAAACCTCGTACTCGCC	CTACC	480
B1c	-----	-----	-----	-----	0
F2	-----	TAGAATCATCTTTTCGAGGTGGAG	-----	-----	23
F3	-----	-----	-----	-----	20
LIC_13162:interrogans	AATATCTTGGAT	TAGAATCATCTTTTCGAGGTGGAGC	TTTAAACCTCGTACTCGTC	CAACC	480
B3	-----	-----	-----	-----	15
F1c	-----	-----	-----	-----	0
LF	-----	-----	-----	-----	0
B2	-----	-----	-----	-----	0
LEP1GSC103_RS07370:borgpetersenii	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATTGCGATGATGGATAAGGT	AAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC048_RS04995:santarosai	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGGATCGCAATGATGGATAAGGT	CAAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC052_3910:tmetyi	GATTGGCGCGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATTGCGATGATGGATAAGGT	AAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC086_RS01765:weilii	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATCGAAATGATGGATAAGGT	CAAAGCGCAGAGACC	-----	540
LEP1GSC193_RS00610:alstonii	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGGATGCGATGATGGACAAAGGT	CAAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC062_RS02165:alexanderi	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATTGCGATGATGGATAAGGT	AAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC049_4098:kirschneri	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATCGAGATGATGGATAAGGT	CAAAGCGCGAAGC	-----	540
LEP1GSC059_RS02910:noguchii	GATTGGAGAGGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATTGAGATGATGGACAAAGGT	AAAGCGCGAAGC	-----	540
B1c	-----	-----	GGTCAAAGCAGAAACT	-----	16
F2	-----	-----	-----	-----	23
F3	-----	-----	-----	-----	20
LIC_13162:interrogans	GATTGGCGCGGTCTC	GGTTGGGAAGGAATTGAGATGATGGATAAGGT	CAAAGCAGAAACT	-----	540
B3	-----	-----	-----	-----	15
F1c	-----	GAGACCGC	-----	-----	8
LF	-----	C	-----	-----	1
B2	-----	-----	-----	-----	0
LEP1GSC103_RS07370:borgpetersenii	GGTCTTCCT	TATGTGACCGAAGTTATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
LEP1GSC048_RS04995:santarosai	GGTCTTCCT	TACGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAT	600
LEP1GSC052_3910:tmetyi	GGTCTTCCT	TACGTAAACGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
LEP1GSC086_RS01765:weilii	GGACTTCCT	TACGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
LEP1GSC193_RS00610:alstonii	GGACTTCCT	TACGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
LEP1GSC062_RS02165:alexanderi	GGTCTTCCT	TACGTGACCGAAGTTATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
LEP1GSC049_4098:kirschneri	GGATTTTCCT	TATGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCTAAACAC	600
LEP1GSC059_RS02910:noguchii	GGGCTTCCT	TATGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	CGCCAAACAC	600
B1c	GGACTTCCT	-----	-----	-----	25
F2	-----	-----	-----	-----	23
F3	-----	-----	-----	-----	20
LIC_13162:interrogans	GGACTTCCT	TATGTGACCGAAGTGATGGAT	CATACGATGGCGGAAGAAGT	TGCTAAACAC	600
B3	-----	-----	-----	-----	15
F1c	-----	-----	GCCAATCGGTT	-----	19
LF	-----	-----	GCCAATCGGTT	-----	12
B2	-----	-----	-----	-----	0
LEP1GSC103_RS07370:borgpetersenii	GCGGATATGATTCA	GATTGGAAGTGAAGTGTCTCAGACTT	CGAACTTCTCGAAGCGGTG	-----	660
LEP1GSC048_RS04995:santarosai	GCGGATATGATTCA	GATCGGAACCGAAGCGCAAGACTTTGA	ACTTCTGGAAGCGGTG	-----	660
LEP1GSC052_3910:tmetyi	GCAGATATGATTCA	GATCGGAACCGAAGCGCAGGATTT	CGAACTTCTCGAAGCTGTG	-----	660

```

LEP1GSC086_RS01765:weilii      GCGGACATGATTCA GATCGGAACGAGAAACGCGCAGGACTTCGAACTTCTCGAAGCGGTG 660
LEP1GSC193_RS00610:alstonii    GCGGACATGATTCA GATCGGAACGAGAAACGCGCAGGACTTTGAACTTCTGGAAGCGGTG 660
LEP1GSC062_RS02165:alexanderi  GCGGACATGATTCA GATCGGAACGAGAAACGCTCAGGACTTTGAACTTCTCGAAGCGGTG 660
LEP1GSC049_4098:kirschneri     GCGGATATGATTCA GATCGGAACTAGAAACGCTCAAGACTTTGAACTTTAGAAAGCGGTG 660
LEP1GSC059_RS02910:noguchii    GCGGATATGATTCA GATCGGAACTAGAAACGCGCAGGATTTGAACTTCTCGAAGCTGTG 660
B1c                             ----- 25
F2                              ----- 23
F3                              ----- 20
LIC_13162:interrogans          GCAGATATGATTCA GATCGGAACTAGAAACGCTCAAGATTTTGAACTTTGAAGCGGTG 660

```

>F3

5' CAAGCCGTCGAACTTGGTAA 3'

>B3

5' TGAATCATATCTGCGTGTTTAGCA 3' 3' TGCTAAACACGCCGATATGATTCA 5'

>F2

5' TAGAATCATCTTTTCGAGGTGGAG 3'

>B2

5' ACTTCTTCCGCCATCGTATG 3' 3' CATACGATGGCGGAAGAAGT 5'

>F1c

5' GAGACCGCGCCAATCGGTTG 3' 3' CAACCGATTGGCGCGGTCTC 5'

>B1c

5' GGTCAAAGCAGAACTGGACTTCCT 3'

Anexo B – Alinhamento de sequências de leptospiiras patogênicas e *primers* do LAMP (LIC20239 – conjunto 1)

Legendas:

AMARELO – nucleotídeos alinhados
 VERMELHO – mismatches
 AZUL ESCURO – sequência do *primer*
 AZUL CLARO – nucleotídeo para adicionar ao *primer*
 ROSA – sequência utilizada no alinhamento

```

B2 ----- 0
B3 ----- 0
LIC_20239:interrogans AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
F2 -----G 1
LEP1GSC052_RS00120:tmetyi AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATTATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
LEP1GSC086_RS18280:weilii AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 111
LEP1GSC059_RS09445:noguchii AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATTATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
LEP1GSC062_RS03380:alexanderi AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
LEP1GSC048_RS0218825:santarosai AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTATCAGGTGCCACG 120
LEP1GSC193_RS18200:alstonii AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
LEP1GSC103_RS0217500:borgpetersenii AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 120
B1c ----- 0
F1c ----- 0
F3 -----GTTGACCTGTCAGGTGCC--- 18
LEP1GSC049_3146:kirschneri AACAACCACGAATTAGTTGAGGACATCATGTTAAAGTCCGTTGACCTGTCAGGTGCCACG 111
  
```

```

B2 ----- 0
B3 ----- 0
LIC_20239:interrogans ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGGTTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
F2 ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGG----- 25
LEP1GSC052_RS00120:tmetyi ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGGTTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
LEP1GSC086_RS18280:weilii ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGATTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 171
LEP1GSC059_RS09445:noguchii ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGGTTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
LEP1GSC062_RS03380:alexanderi ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGGTTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
LEP1GSC048_RS0218825:santarosai ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGATTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
LEP1GSC193_RS18200:alstonii ACGATTAAGTCGTTTTTCATAGGTTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
LEP1GSC103_RS0217500:borgpetersenii ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGATTTCAGTCCGTATGGAGTGAGCGGCGTGGTTGTTGTT 180
  
```



```

B1c ----- 0
F1c -----GTGAGCGCGCTGTTGTTGT----- 20
F3 ----- 18
LEP1GSC049_3146:kirschneri ACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGATTCAGTCCGTATGGA GTGAGCGCGCTGTTGTTGT T 171

B2 -----GCTGGACGTA 10
B3 ----- 0
LIC_20239:interrogans AGTGAA TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGTTATTGTGC CGTGGACGTA 240
F2 ----- 25
LEP1GSC052_RS00120:tmetyi AGTGAG TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGCTACTGTGC CGTGGACGTA 240
LEP1GSC086_RS18280:weilii AGCGAG TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGCTATTGTGC CGTGGACGTA 231
LEP1GSC059_RS09445:noguchii AGTGAA TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGTTATTGTGC CGTGGACGTA 240
LEP1GSC062_RS03380:alexanderi AGTGAG TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGCTATTGTGC CGTGGACGTA 240
LEP1GSC048_RS0218825:santarosai AGTGAG TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGCTATTGTGC CGTGGACGTA 240
LEP1GSC193_RS18200:alstonii AGTGAA TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGCTACTGTGC CGTGGACGTA 240
LEP1GSC103_RS0217500:borgpetersenii AGTGAA TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGTTATTGTGC CGTGGACGTA 240
B1c -----TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC----- 25
F1c ----- 20
F3 ----- 18
LEP1GSC049_3146:kirschneri AGTGAA TCCCATTTTGC GATTTCATACCTGGC CCGAATACGGTTATTGTGC CGTGGACGTA 231

B2 TTTACCTGTGG----- 21
B3 -----GATCTCAT TGATAATCAGGCTGC----- 23
LIC_20239:interrogans TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTAAAAGAGAAATTT 300
F2 ----- 25
LEP1GSC052_RS00120:tmetyi TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGACTATCTGAAAGAGAAATTC 300
LEP1GSC086_RS18280:weilii TTTACCTGTGGAGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTGAAAGAGAAACTC 291
LEP1GSC059_RS09445:noguchii TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTAAAAGAGAAATTT 300
LEP1GSC062_RS03380:alexanderi TTTACCTGTGGAGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTGAAAGAGAAACTC 300
LEP1GSC048_RS0218825:santarosai TTTACCTGTGGAGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTGAAAGAGAAATTC 300
LEP1GSC193_RS18200:alstonii TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTGAAAGAGAAATTT 300
LEP1GSC103_RS0217500:borgpetersenii TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTAAAAGAGAAATTT 300
B1c ----- 25
F1c ----- 20
F3 ----- 18
LEP1GSC049_3146:kirschneri TTTACCTGTGGGATCTCAT TGATAATCAGGCTGC CCTGGATTATCTAAAAGAGAAATTT 291

```

>F3

5' GTTGACCTGTCAGGTGCC 3'

>B3

5' GCAGCCTGATTATCAATGAGATC 3' 3' GATCTCATTGATAATCAGGCTGC 5'

>F2

5' GACGATTAAGTCGGTTTTTCATAGG 3'

>F1c

5' ACAACAACCACGCCGCTCAC 3' 3' GTGAGCGGCGTGTTGTTGT 5'

>B2

5' CCACAGGTAAATACGTCCACG 3' 3' GCTGGACGTATTACCTGTGG 5'

>B1c

5' TCCCATTTTGCGATTCATACCTGGC 3'