

NOVO PROTOCOLO HRM COM MÚLTIPLOS GENES ALVO PARA DETECÇÃO DIRETA E DIFERENCIAÇÃO DOS SOROVARES PATOGENICOS RELEVANTES DE *LEPTOSPIRA*

OLUWAGBEMIGA ADEMOLA DADA¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²;
DIAGO DUTRA LIMA³; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁴; ODIR ANTONIO
DELLAGOSTIN⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária

¹Universidade Federal de Pelotas - doluwagbemiga@yahoo.com

²Universidade Federal de Pelotas - dallmannpaola@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - diagolima@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - kauerodriguez@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - odirad@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de importância global para a saúde, causada por *Leptospira* spp., principalmente a espécie *Leptospira interrogans* (ALDER; MOCTEZUMA, 2010; JANCLOES, 2014; HAGEDOORN et al., 2024). Esta é altamente endêmica em regiões úmidas e subtropicais, como o Brasil, com diversos animais identificados como fontes de infecção humana. Em animais, a leptospirose é clinicamente caracterizada por múltiplas lesões orgânicas e abortos, sendo, portanto, uma fonte significativa de perdas econômicas.

A detecção e a caracterização de *Leptospira* a partir de amostras clínicas, através de técnicas moleculares, é crítica para a epidemiologia da leptospirose, o desenvolvimento de vacinas, a prevenção e o tratamentos direcionados (AHMED et al., 2011). Também facilita a descoberta de novas espécies e sorovares.

Embora diversos protocolos moleculares tenham sido descritos para a caracterização de *Leptospira* (ROMERO et al., 2009; SANTOS et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2022; PACCE et al., 2022), poucos possuem a capacidade de detectar diretamente espécies de *Leptospira* em amostras clínicas.

Além disso, muitas dessas técnicas são caras, demoradas e inadequadas para diferenciar entre espécies patogênicas e intermediárias. A pesquisa contínua por métodos de tipagem acessíveis levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares independentes de cultura, como a análise de *high resolution melt* (HRM), que oferece dados digitais comparáveis entre países (HARTSKEERL; SMYTHE, 2015).

O HRM utiliza químicas acessíveis como o EvaGreen®, realizado em instrumentos de PCR em tempo real sem a necessidade de sondas, tornando-o relativamente barato e fácil de implementar. O princípio básico é a geração de perfis de curva de fusão, resultantes de variações de sequência em DNA de fita dupla. Este método é mais rápido, realizado em menos de 2 horas, com redução significativa do risco de contaminação e alta especificidade em comparação a outros métodos. O potencial da análise HRM para detectar e diferenciar duas espécies de *Babesia* (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) foi avaliado por GIGLIOTI et al. (2021). Além disso, PELÁEZ-SÁNCHEZ et al. (2017) diferenciaram com sucesso 11 espécies de *Leptospira* com base nas temperaturas de fusão (T_m) e perfis de curva em um ensaio de PCR-HRM. No entanto, o estudo relatou limitações em sua

capacidade de distinguir entre algumas espécies e recomendou a inclusão de marcadores genéticos adicionais.

Também há necessidade de validar os ensaios HRM para o diagnóstico de *Leptospira* usando amostras clínicas. Para avançar no conhecimento existente, este estudo pretende direcionar três regiões do DNA de *Leptospirajá* definidas para amplificação e caracterização de sorovares diretamente de amostras clínicas, utilizando uma análise multiplex qPCR-HRM. Este estudo também pretende conduzir estudos de validação abrangentes, essenciais para avaliar as características de desempenho (sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade) dos ensaios HRM, que faltaram em estudos anteriores (TULSANI et al., 2010; NAZE et al., 2015; HARRISON; HANSON, 2017; ESTEVES et al., 2018). Nenhum desses relatórios sobre análise HRM conseguiu validar ou compará-la com o sequenciamento. O objetivo deste estudo será, portanto, desenvolver e validar um ensaio molecular de diagnóstico de leptospirose simples, rápido e de baixo custo, baseado em multiplex-qPCR-HRM.

2. METODOLOGIA

Para atingir o objetivo estabelecido, as sequências gênicas publicadas para rRNA 16S, lipL32 e secY foram baixadas do GenBank e utilizadas para a análise. Três regiões-alvo no RNA 16S foram selecionadas. Após a classificação, grupos de sequências foram obtidos e inspecionados visualmente para selecionar as regiões-alvo por alinhamentos múltiplos com o algoritmo Clustal W, incluído no programa BioEdit versão 7.2.5 (HALL, 1999).

Os cinco conjuntos de primers foram projetados com base nos seguintes objetivos: (i) distinção precisa entre espécies infecciosas e não infecciosas de *Leptospira*; (ii) detecção específica e diferencial de espécies patogênicas de *Leptospira*; (iii) e detecção diferencial de *Leptospira* a nível de subespécies. Os primers foram projetados nas regiões conservadas utilizando a ferramenta online Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para produzir amplicons de PCR de diferentes tamanhos e diferentes conteúdos de GC, para permitir separação suficiente entre as regiões de fusão dos patógenos-alvo em consideração. A especificidade de cada sequência de primer foi verificada utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (NCBI/Primer-BLAST).

Para evitar reações de amplificação ineficientes, como a formação de dímeros de primer, todos os primers também foram verificados quanto às suas propriedades termodinâmicas, estruturas secundárias e interações primer-primer usando os programas Oligo-Explorer v1.2 e Oligo-Analyzer v1.1.2 (Gene LinkTM, Estados Unidos). Finalmente, os conjuntos de primers mais promissores, com potencial de detectar espécies infecciosas de *Leptospira* e discriminar entre as diferentes espécies do grupo patogênico de *Leptospira*, foram selecionados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

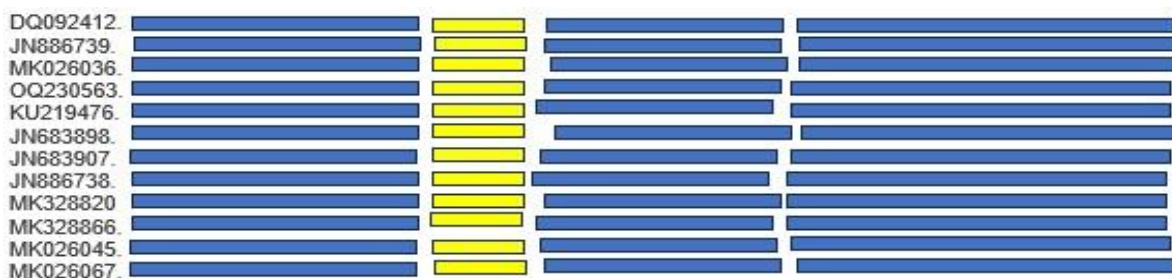


Fig 1: Ilustração dos resultados de alinhamento de sequências múltiplas para o gene lipL32. As barras azuis mostram as regiões conservadas, enquanto as barras amarelas representam a região variável

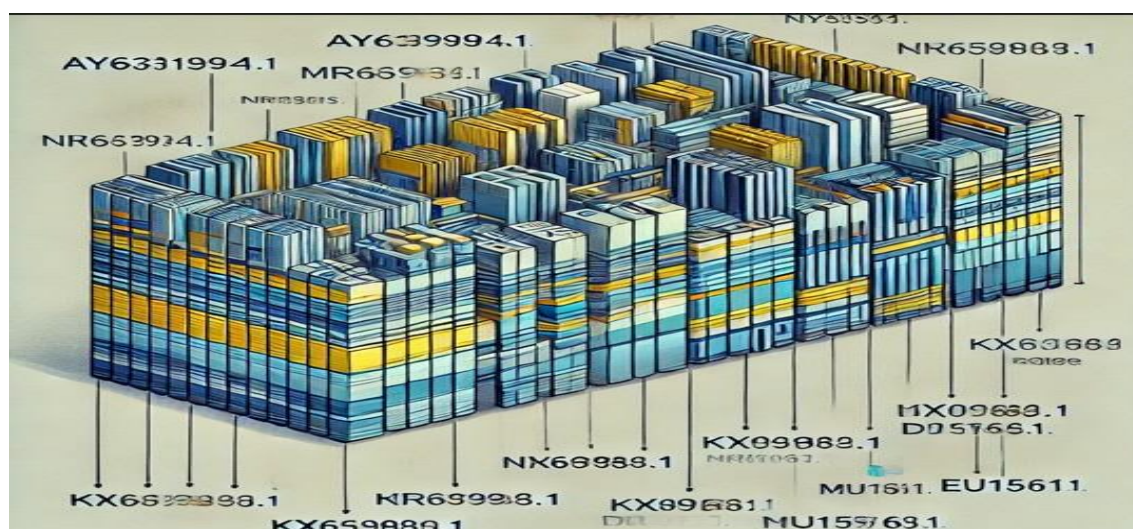


Fig 2: Ilustração dos resultados de alinhamento de sequências múltiplas para o gene rRNA 16S. As barras azuis mostram as regiões conservadas, enquanto as barras amarelas representam a região variável

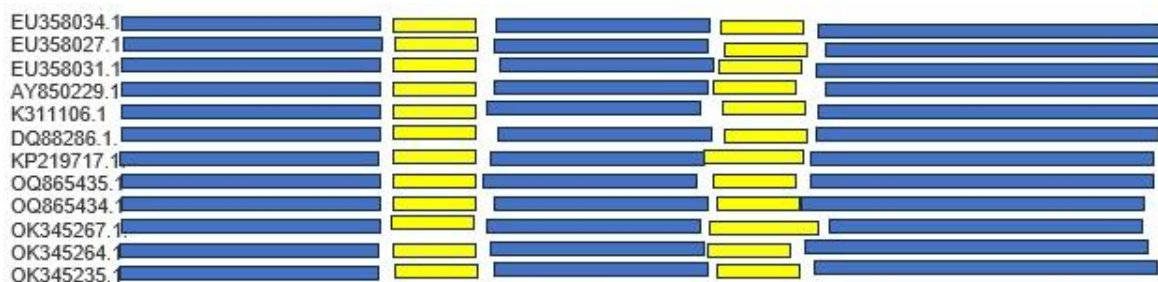


Fig 3: Ilustração dos resultados de alinhamento de sequências múltiplas para o gene secY. As barras azuis mostram as regiões conservadas, enquanto as barras amarelas representam a região variável

4. CONCLUSÕES

Os primers desenvolvidos demonstraram o potencial de amplificar os genes-alvo e diferenciar entre várias espécies patogênicas de *Leptospira*. Esses primers serão submetidos para aprovação de patente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. D. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- DE OLIVEIRA, N. R. et al. Pathogenesis and genomic analysis of a virulent *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* isolated from a dog with lethal infection. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 333, 2022.
- AHMED, A. et al. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, v. 3, n. 2, p. 133, 2012.
- ESTEVES, L. M. et al. Diagnosis of human leptospirosis: high resolution melting analysis for direct detection of *Leptospira* in the early stage of the disease in a clinical setting. **BioRxiv**, 2018.
- GIGLIOTI, R. et al. Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: a novel and sensitive qPCR-based method. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, article 100074, 2022.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.
- HAGEDOORN, N. N. et al. Global distribution of *Leptospira* serovar isolations and detections from animal host species: a systematic review and online database. **Tropical Medicine & International Health**, v. 29, n. 3, p. 161–172, 2024.
- HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494–501, 2011.
- JANCLOES, M. et al. Towards a "One Health" strategy against leptospirosis. **Planet@Risk**, v. 2, p. 204–206, 2014.
- NAZE, F. et al. Use of a new high-resolution melting method for genotyping pathogenic *Leptospira* spp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, e0127430, 2015.
- PACCE, V. D. et al. Polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification targeting *lic13162*, *lic20239*, and *lipL32* genes for leptospirosis diagnosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 1029–1037, 2022.
- PELÁEZ SÁNCHEZ, R. G. et al. High-resolution melting curve analysis of the 16S ribosomal gene to detect and identify pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in Colombian isolates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1031–1038, 2017.
- TULSIANI, S. M. et al. High-resolution melt-curve analysis of random-amplified-polymorphic-DNA markers for the characterization of pathogenic *Leptospira*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, p. 151–161, 2010.