

Filipa Liliana Antunes Correia

**DESENHO E MONTAGEM DE MÉTODO RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA  
BORRELIOSE DE LYME POR PCR EM TEMPO REAL**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2007



Filipa Liliana Antunes Correia

**DESENHO E MONTAGEM DE MÉTODO RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA  
BORRELIOSSE DE LYME POR PCR EM TEMPO REAL**

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2007

Filipa Liliana Antunes Correia

**DESENHO E MONTAGEM DE MÉTODO RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA  
BORRELIOSSE DE LYME POR PCR EM TEMPO REAL**

Assinatura:

Monografia apresentada à Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Licenciado em Análises Clínicas e Saúde  
Pública.

## RESUMO

A detecção de espécies através do DNA por métodos moleculares, nomeadamente por PCR em tempo real, é uma das técnicas bastante procuradas hoje em dia. Este tipo de técnica é, uma técnica rápida, muito específica e de extrema sensibilidade que permite não só a detecção bem como a quantificação de um sinal fluorescente proporcional à amplificação do produto de PCR específico da espécie. A aplicação do PCR em tempo real à microbiologia, nomeadamente à detecção de bactérias, facilita o diagnóstico de infecções bacterianas particularmente nas de difícil diagnóstico em que os sinais e sintomas possam ser comuns a outras patologias e/ou tenham períodos de latência como é, entre muitos outros, o caso da Borreliose de Lyme causada pela *Borrelia burgdorferi*. É no DNA que se encontra a informação genética específica de cada espécie, daí a extrema especificidade e sensibilidade desta técnica identificando uma sequência específica de um “gene alvo” que identifica a bactéria.

Dos métodos habitualmente utilizados para a detecção de *Borrelia*, os métodos culturais apresentam tempos de resposta longos (aproximadamente 16 dias). Os métodos imunológicos são também muito usados visto serem também testes rápidos e relativamente baratos no entanto apresentam alguns problemas de interpretação. Um dos métodos imunológicos mais usados é o imunoensaio ELISA cuja principal limitação é a falta de padronização. Outro problema associado aos métodos imunológicos é o facto de, numa fase inicial da doença os anticorpos poderem não ser detectáveis. No presente trabalho testou-se a possibilidade de através de PCR em tempo real detectar a espécie *Borrelia burgdorferi* através de *primers* capazes de hibridar com o “gene alvo” da espécie e de uma sonda capaz de fazer a detecção. Para tal, procurou otimizar-se um protocolo que nos permitisse detectar a espécie *Borrelia burgdorferi* com a maior especificidade, sensibilidade e rapidez que esta técnica é capaz de fornecer.

## **DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS**

Quero dedicar este trabalho aos meus pais pelo apoio que me deram ao longo de todos estes anos, à minha mãe pela amizade incondicional que me presta diariamente e ao meu pai de quem tanto me orgulho. À minha irmã e à pequena Lua. Ao Professor Doutor José Manuel Cabeda o meu muito obrigado não só por me ter proporcionado a realização deste trabalho, mas principalmente pela aprendizagem que ao longo dele me transmitiu. À Mariana, pessoa que me acompanhou na realização deste trabalho esperando por cada resultado tão ou mais ansiosa que eu. Quero agradecer a todos os meus amigos (felizmente muitos) que sempre acreditaram e me apoiaram, nomeadamente à Raquel, aos pais da Raquel, Joana Duarte, Joazito, Susaninha, Joana Machado, Rita, Nuno, Anita e Inês Madeira. A todos os meus amiguinhos do Sudoeste pelos momentos de diversão que me proporcionaram, obrigada.

*“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais volta ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Aspectos clínicos da Borreliose de Lyme .....	14
1.2. <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> .....	15
1.3. Aspectos laboratoriais .....	18
1.3.1. Cultura isolada e detecção directa da bactéria .....	18
1.3.2. Testes histopatológicos .....	19
1.3.3. Testes imunológicos .....	20
1.3.4. Testes moleculares .....	21
1.4. PCR .....	22
1.4.1. <i>Master Mix</i> .....	23
1.4.2. Fases da reacção do PCR .....	23
1.4.2.1. Primeiro passo: Desnaturação pelo calor .....	23
1.4.2.2. Segundo passo: <i>Annealing</i> .....	24
1.4.2.3. Terceiro passo: Extensão .....	24
1.5. PCR em tempo real (qPCR) .....	26
1.5.1. Métodos de detecção .....	27
1.5.1.1. <i>SYBR Green</i> .....	27
1.5.1.2. Sondas de hibridação ou sondas FRET .....	27
1.5.1.3. Sonda <i>Molecular beacons</i> .....	28
1.5.1.4. Sondas <i>TaqMan</i> .....	29
1.5.2. Optimização de protocolos de PCR em tempo real .....	29
1.5.2.1. Desenho dos <i>primers</i> e sondas .....	30
1.5.2.2. Desoxirribonucleotídeos Fosfatados dNTPs .....	30
1.5.2.3. Taq polimerase .....	31
1.5.2.4. Tampão .....	31
1.5.2.5. MgCl <sub>2</sub> .....	31
1.5.2.6. Ciclos: número, tempo e temperaturas nas diferentes fases .....	32
1.5.3. Reacção <i>multiplex</i> .....	33
1.5.4. Detecção/Quantificação em LightCycler .....	33
1.6. Objectivos .....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.1. Amostras .....	36
2.2. Extracção de DNA de peças em parafina .....	36
2.3. <i>Primers</i> e sonda para a detecção do Gene 16S rRNA .....	37
2.4. Amplificação do Gene 16S rRNA .....	37
2.5. Análise dos produtos de PCR .....	40
2.5.1. LightCycler .....	40

<b>2.5.2. Electroforese</b> .....	40
<b>3. RESULTADOS</b> .....	42
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	57
<b>ANEXO I</b> .....	58
<b>ANEXO II</b> .....	66
<b>ANEXO III</b> .....	67
<b>ANEXO IV</b> .....	68
<b>ANEXO V</b> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> – Ciclo da infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> no nordeste dos EUA e intersecção com a Borreliose de Lyme.....	17
<b>Fig. 2</b> – Primeiro passo do ciclo de PCR: Desnaturação pelo calor.....	23
<b>Fig. 3</b> – Segundo passo do ciclo de PCR: hibridação (ou <i>annealing</i> ) dos <i>primers</i> .....	24
<b>Fig. 4</b> – Terceiro passo do ciclo de PCR: Extensão.....	25
<b>Fig. 5</b> – Fim do ciclo de PCR.....	25
<b>Fig. 6</b> – Amplificação exponencial do DNA na reacção de PCR.....	26
<b>Fig. 7</b> – Detecção por <i>SYBR Green</i> .....	28
<b>Fig. 8</b> – Detecção por sondas de hibridação ou sondas FRET.....	28
<b>Fig. 9</b> – Detecção por sondas <i>Molecular beacons</i> .....	29
<b>Fig. 10</b> – Detecção por sondas <i>TaqMan</i> .....	30
<b>Fig. 11</b> – Detecção/quantificação dos amplicões em Lightcycler.....	35
<b>Fig. 12</b> – Resultados do ensaio 1.....	43
<b>Fig. 13</b> – Resultado dos ensaios 2 e 3.....	46
<b>Fig. 14</b> – Resultado dos ensaios 4 e 5 ambos com [MgCl <sub>2</sub> ] de 3,0 mM.....	46
<b>Fig. 15</b> – Resultado dos ensaios 6, 7, 8 e 9 com duas fases de extensão, a primeira a 60°C e a segunda a 68°C.....	47
<b>Fig. 16</b> – Resultado do ensaio 10 com uma fase de extensão a 68°C durante 40 segundos com uma velocidade de 5°C/s.....	48
<b>Fig. 17</b> – Resultado do ensaio 11 com um tempo de desnaturação de 5 segundos.....	48
<b>Fig. 18</b> – Resultado dos ensaios 12 e 13.....	49
<b>Fig. 19</b> – Resultado dos ensaios 14 e 15.....	50
<b>Fig. 20</b> – Resultado dos ensaios 16 e 17 ambos com uma temperatura de extensão de 68°C.....	50
<b>Fig. 21</b> – Resultado do ensaio 18 para [MgCl <sub>2</sub> ] de 3,5 mM e 50 ciclos.....	51
<b>Fig. 22</b> – Resultado do ensaio 25 com [MgCl <sub>2</sub> ] de 6,5 mM.....	51

<b>Fig. 23</b> – Resultados do ensaio 26 com uma [MgCl <sub>2</sub> ] de 6,5 mM e com 0,5μM de concentração do <i>primer</i> 16s2a.....	52
<b>Fig. 24</b> – Resultado do ensaio 28.....	53
<b>Fig. 25</b> – Resultado do ensaio 29.....	53
<b>Fig. 26</b> – Resultado do ensaio 30.....	54
<b>Fig. 27</b> – Resultados Blast entre os primers e sonda utilizados no trabalho, e as sequências do genoma humano com maior semelhança.....	55
<b>Fig. 28</b> – Resultados Blast entre os primers e sonda utilizados no trabalho, e as sequências de bactérias com maior semelhança.....	56
<b>Fig. 29</b> – Ensaios de reprodutibilidade.....	58

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Patogenicidade associada aos vectores das diferentes genoespécies de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. nas diferentes áreas geográficas.....	16
<b>Tabela 2 –</b>	Amostras biológicas mais adequadas para análise de PCR consoante as diferentes manifestações clínicas da Borreliose de Lyme.....	21
<b>Tabela 3 –</b>	Sequência da sonda <i>Taqman</i> e dos <i>primers</i> desenhados.....	38
<b>Tabela 4 –</b>	Lista das condições testadas para a optimização do protocolo de amplificação do Gene 16S rRNA de <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	40
<b>Tabela 5 –</b>	Sumário das condições testadas e dos respectivos resultados (Ct) observados.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

- [**MgCl<sub>2</sub>**] – concentração de cloreto de magnésio
- µg** – micrograma;
- µL** – micro-Litro;
- µm** – micrómetro;
- µM** – micro-Molar;
- Ac** – Anticorpos;
- Ag** – Antígenos;
- BL** – Borreliose de Lyme;
- BSA** – Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumine*);
- Ct** – Ciclo linear de amplificação (do inglês *Cycle threshold*);
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*);
- dNTPs** – desoxirribonucleotídeos trifosfatados (do inglês *deoxynucleotide triphosphates* );
- EDTA** – ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*);
- ELISA** – do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay;
- FRET** – Transferência de energia fluorescente por ressonância (do inglês *Fluorescent Resonance Energy Transfer*);
- HCl** – Cloreto de Hidrogénio;
- IgG** – Imunoglobulina G;
- IgM** – Imunoglobulina M;
- KCl** – Cloreto de Potássio;
- MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Magnésio;
- ml** – mililitro;
- mM** – mili-Molar;
- NCBI** – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês *National Center for Biotechnology Information*);
- NTC** – Controlo sem DNA (do inglês *Non-template-control*);
- Osp's** – Proteínas de Superfície;
- OspA** – Proteína de Superfície A;
- OspC** – Proteína de Superfície C;
- pb** – Pares de Base;
- PCR** – Reacção em Cadeias da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*);
- s.l.** – *sensu lato*;
- SNC** – Sistema Nervoso Central;
- SNP** – Sistema Nervoso Periférico;
- Tm** – Temperatura de fusão (do inglês *melting temperature*);

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos clínicos da Borreliose de Lyme

A Borreliose de Lyme (BL) é uma patologia inflamatória multisistémica que pode dar origem a sintomatologia dermatológica, neurológica, cardíaca e musculoesquelética. É causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) que é transmitida ao Homem através de um vector artrópode, uma carraça que pertence ao complexo *Ixodes ricinus*. A doença apresenta manifestações clínicas diferentes consoante a espécie de *Borrelia burgdorferi* s.l. predominante nas diferentes áreas geográficas e consequentemente, os diferentes vectores associados a estas áreas. (Ferreira WFC, 2000; Agüero-Rosenfeld ME 2005).

Esta doença tem um período de incubação médio de 3 a 30 dias que têm início logo após a picada do artrópode infectado e evolui em três fases podendo envolver vários órgãos e tecidos (Ferreira WFC, 2000; Reed KD, 2002).

Numa primeira fase da doença há o aparecimento do Eritema Migrans Primário. Esta lesão cutânea, aparece entre a primeira e a quarta semana após a picada do vector. O Eritema Migrans aparece nas zonas da picada (mais frequentemente nas coxas, nádegas e membros superiores), juntamente com uma série de sintomas gerais tais como arrepios, febre, cefaleias, mialgias, astenia e, mais raramente, dores articulares. Os sintomas descritos desaparecem espontaneamente podendo voltar a aparecer mais tarde (Ferreira WFC, 2000; Reed KD, 2002).

A segunda fase ocorre quando há disseminação hematogénea da espécie. Esta disseminação da infecção dura entre 1 semana a 6 meses sendo os sintomas frequentemente intermitentes. Nesta fase aparecem múltiplas lesões na pele chamadas de Eritema Migrans Secundários. Consoante os órgãos ou tecidos afectados os sintomas podem revelar-se por artralgias, manifestações neurológicas, meningites, radioneurites, bloqueio átrio-ventricular ou miocardites. Com uma terapêutica adequada este período sintomático pode ser interrompido. Caso não haja aplicação de uma terapêutica ocorre habitualmente a evolução para uma infecção latente que pode durar de 6 meses até 30

anos (Ferreira WFC, 2000; Reed KD, 2002).

A terceira fase ocorre quando a infecção persiste e corresponde a um período de cronicidade da doença. Nesta fase há um envolvimento neurológico que pode ser ao nível do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP). No caso do envolvimento do SNC observam-se alterações da memória, do sono, da concentração, do estado psíquico e em menor grau da linguagem do indivíduo. Se o envolvimento é do SNP pode originar zumbidos ou fenómenos dolorosos que ocorrem principalmente nas zonas de enervação de ramos dos nervos atingidos. Menos frequentemente podem também surgir lesões oculares (Ferreira WFC, 2000).

São conhecidos, para além da *Borrelia burgdorferi* s.l., outros géneros de Borrelia. Cada género de Borrelia está associado a um vector artrópode, a um possível animal hospedeiro, a uma distribuição geográfica diferente e a uma patologia (Ferreira WFC, 2000).

### **1.2. *Borrelia burgdorferi* s.l.**

A *Borrelia burgdorferi* é um microorganismo em forma de espiroqueta pertencente às eubactérias com um comprimento que pode variar entre os 3 e os 30 µm e um diâmetro entre 0,2 e 1 µm. A sua parede celular possui uma membrana citoplasmática rodeada de peptidoglicano e é flagelada o que lhe confere grande flexibilidade e mobilidade (Steere AC, 2004).

O genoma desta bactéria já foi completamente sequenciado e consiste num cromossoma linear e 21 plasmídeos dos quais 9 são circulares e 12 são lineares (Aguero-Rosenfeld ME, 2005; Derdáková M, 2005).

Esta bactéria possui um largo número de sequências não codificantes, lipoproteínas e proteínas de superfície (Osp's), nomeadamente a A e F, que lhe conferem uma enorme variabilidade intraespecífica (Steere AC, 2004). Estudos recentes sugerem que esta variabilidade pode ser um factor importante para a determinação da Borreliose de Lyme (Derdáková M, 2005).

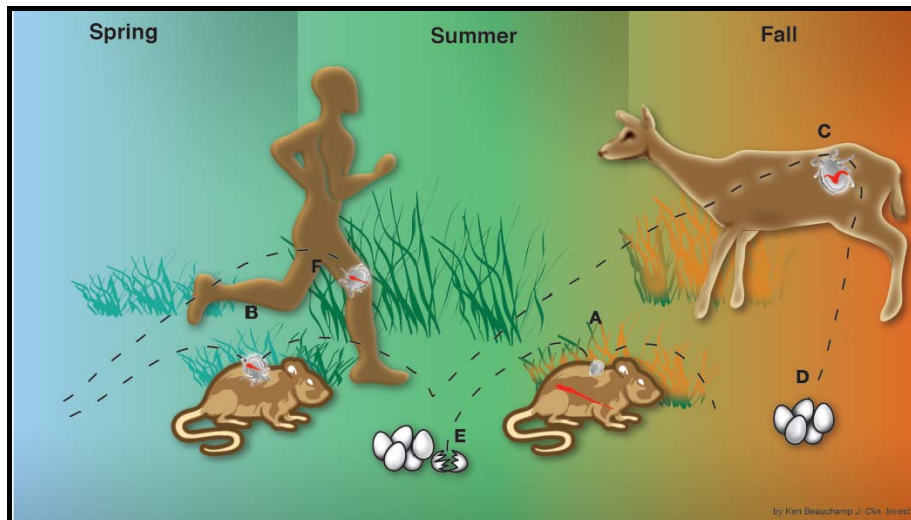
Dentro do género *Borrelia burgdorferi* s.l. existem diversas genoespécies localizadas em diferentes áreas geográficas, sendo apenas algumas destas patogénicas para o Homem (tabela 1).

Tabela 1 – Patogenicidade associada aos vectores das diferentes genoespécies de *Borrelia burgdorferi* s.l. nas diferentes áreas geográficas (Steere AC, 2004).

Área geográfica	Génoespecie	Vector associado	Patogenicidade
Estados Unidos da América	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>Ixodes scapularis</i> ; <i>Ixodes pacificus</i>	Patogénica
	<i>Borrelia andersonii</i>	<i>Ixodes dentatus</i>	Não patogénica
	<i>Borrelia bissettii</i>	<i>Ixodes pacificus</i> ; <i>Ixodes spinipalpis</i>	Possível patogénica
Europa	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Patogénica
	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Patogénica
	<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Possível patogénica
	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Possível patogénica
	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Patogénica
Ásia	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Patogénica
	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Patogénica
	<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Não patogénica
	<i>Borrelia japónica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	Não patogénica
	<i>Borrelia tanukii</i>	<i>Ixodes tanukii</i>	Não patogénica
	<i>Borrelia turdae</i>	<i>Ixodes turdus</i>	Não patogénica
	<i>Borrelia sinica</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>	Não patogénica

Verifica-se então que, das diferentes genoespécies, apenas três são patogénicas para o Homem (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*; *Borrelia garinii*; *Borrelia afzelii*). Adicionalmente três apresentam elevado potencial de serem patogénicas para o Homem (*Borrelia bissettii*; *Borrelia valaisiana*; *Borrelia lusitaniae*) (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

As três espécies patogénicas habitam em ciclos sazonais na natureza e envolvem carraças da família *Ixodes* e vários tipos de animais hospedeiros. Estes ciclos tiveram uma evolução divergente que varia de acordo com a área geográfica. Os vectores importantes nas três espécies patogénicas são o *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* nos Estados Unidos; o *Ixodes ricinus* na Europa e o *Ixodes persulcatus* na Ásia (Steere AC, 2004).



Estes ciclos sazonais ocorrem preferencialmente durante a primavera e no princípio do verão, transmitindo *Borrelia burgdorferi* entre as larvas e ninfas das carraças a roedores, aves e répteis originando sazonalmente uma elevada taxa de infecções (Fig. 1) (Steere AC, 2004).

Nos locais onde a taxa da Borreliose de Lyme é baixa são necessários dois ciclos que se

intersectam para que haja transmissão da doença. O primeiro envolve as carraças que não mordem humanos e apenas mantêm o ciclo na natureza, o outro envolve as que passam a doença ao Homem (Fig. 1) (Steere AC, 2004).

A *Borrelia* encontra no vector melhores condições de sobrevivência devido ao ambiente, temperatura e alimentação de sangue. A migração da bactéria para o vector está associada com a variabilidade de expressão proteica entre outras circunstâncias. Quando os vectores não picam o Homem, a bactéria permanece no esófago do vector onde apenas expressa a proteína de superfície A (OspA) (a OspC não é expressa). Esta proteína produz um receptor para o plasminogéneo do organismo do hospedeiro. Depois do vector se alimentar do hospedeiro, o plasminogéneo passa a plasmina facilitando a passagem da *Borrelia* para as células sanguíneas e paredes do esófago. Durante a refeição de sangue é estabelecido um aumento da síntese de OspC e uma diminuição da OspA. Associa-se o aumento da expressão da proteína de superfície OspC com a resposta imune do hospedeiro na fase inicial da doença e a expressão da proteína OspA à mudança de temperatura durante a alimentação do vector (Derdáková M, 2005).

### **1.3. Aspectos laboratoriais**

Para o diagnóstico laboratorial da Borreliose de Lyme é necessário conhecer a história clínica do paciente bem como os sinais e sintomas que este apresenta. É igualmente importante ter em conta os hábitos do doente e o meio onde este habita pois, a prevalência desta doença é mais elevada em meios rurais. Com esta informação são então solicitados testes laboratoriais que podem ser de vários tipos:

#### **1.3.1. Cultura isolada e detecção directa da bactéria**

Faz-se a partir de lesões ou produtos biológicos colhidos dos doentes. As amostras mais usadas são as biópsias da pele ou lavagens cutâneas dos Eritema Migrans. Pode usar-se também sangue do paciente em que tenha havido uma disseminação precoce da doença. As taxas de obtenção de culturas positivas para amostras de sangue são mais elevadas para Eritema Migrans Secundários do que para Primários. Pode isolar-se também a bactéria do líquido cerebrospinal ou sinovial contudo não é frequente pois nestes locais

anatômicos a taxa de organismos viáveis é baixa (Reed KD, 2002).

A cultura das amostras biológicas é feita em meio de Barbour-Stoenner-Kelly e a detecção da presença das características das espiroquetas é feita por microscopia de fluorescência com laranja de acridina ou anticorpos (Ac) específicos fluorescentes. Pode fazer-se também esta detecção por microscopia de campo escuro (Reed KD, 2002).

É importante ter em conta o tempo de incubação das culturas para a detecção positiva da espécie. O tempo ideal de incubação é de aproximadamente 16 dias (Reed KD, 2002).

### **1.3.2. Testes histopatológicos**

Os testes histopatológicos para diagnóstico da Borreliose de Lyme não revelam grande especificidade e são normalmente usados para excluir outras patologias (Reed KD, 2002).

Podem usar-se biópsias representativas do Eritema Migrans que mostrem o edema como depósitos de mucinas, infiltrados perivasculares de macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, células plasmáticas das camadas superficiais e profundas da pele. O elevado grau de celulite devido a uma infecção secundária e as reacções alérgicas às picadas do vector podem mascarar estas características e complicar a interpretação dos resultados (Reed KD, 2002).

Alguns investigadores usam marcação com nitrato de prata, fosfatase alcalina ou imunoperoxidases para detectar o microorganismo infiltrado na amostra. Estas preparações são igualmente de difícil interpretação devido à possível presença de fibras elásticas e/ou outros filamentos que podem mascarar a espiroqueta (Reed KD, 2002).

Considera-se então esta técnica pouco específica e limitada visto a obtenção de amostras não ser muitas das vezes representativa e a interpretação dos resultados estar dependente, não só do conjunto de factores já referidos bem como, da experiência do técnico que observa os resultados (Reed KD, 2002).

### 1.3.3. Testes imunológicos

Apesar dos testes imunológicos apresentarem alguns problemas de interpretação, estes são habitualmente usados pois, são rápidos e de implementação relativamente barata.

Os testes mais usados são os baseados na imunofluorescência directa e o teste de ELISA utilizando antigénios (Ag) específicos com a finalidade de detectar anticorpos (Ac) contra a bactéria (*Borrelia burgdorferi* s.l.) ou anticorpos específicos que reajam com a bactéria. Resultados que suscitem dúvidas devem ser confirmados por técnicas de *Western Blot* (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Nos testes de imunofluorescência directa utilizam-se organismos fixados em lâminas. Pode ser necessário diluir a amostra e incluir um composto absorvente com o objectivo de remover os anticorpos não específicos. Adiciona-se um composto fluorescente anti-IgG ou IgM humano para que os anticorpos sejam detectados através de um microscópio de fluorescência. Esta técnica implica não só que haja um microscópio de fluorescência bem como, técnicos experientes capazes de interpretar os resultados ao microscópio (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

O imunoensaio ELISA é o mais utilizado para detecção serológica da bactéria. Uma das limitações desta técnica é a falta de padronização. Existem variações nos ensaios a nível da composição dos antigénios e na detecção de classes específicas de imunoglobulinas, nomeadamente na detecção de anticorpos IgM. As variações podem ocorrer pelo facto de se usarem *kits* comerciais diferentes ou até mesmo dentro do mesmo *kit*. Pode não se detectar os anticorpos da bactéria numa fase inicial da doença o que leva a um agravamento desta. A sensibilidade deste ensaio aumenta com a evolução da doença e com a recolha da amostra adequada para a fase em que se encontra a doença (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

O uso de *Western Blot* utiliza-se para detectar qual o antigénio imunodominante da *Borrelia* presente nas diferentes fases da *Borreliose de Lyme* (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

### 1.3.4. Testes moleculares

Um outro método usado hoje em dia em laboratórios especializados é o da detecção de ácido desoxirribonucléico (DNA) da bactéria *Borrelia burgdorferi* através da técnica da reacção em cadeias de polimerase (PCR). Esta é uma técnica rápida, muito específica e extremamente sensível que tem como objectivo amplificar as sequências de ácido nucleico da espécie de *Borrelia burgdorferi* s.l. (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

O DNA é composto por longas cadeias de polinucleótidos em que, cada nucleótido é constituído por um açúcar, uma base aminada e um grupo fosfato. Nele encontra-se a informação genética específica de cada ser vivo explicando assim a elevada especificidade e sensibilidade deste tipo de técnicas (Roche, 2003).

Dependendo das manifestações clínicas da doença deve proceder-se à recolha do material biológico mais adequado para analisar por PCR. Podem ser usadas amostras de sangue, biópsias de tecido, líquido cefaloraquidiano, fluido sinovial e urina (tabela 2) (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Tabela 2 – Amostras biológicas mais adequadas para análise de PCR consoante as diferentes manifestações clínicas da Borreliose de Lyme (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

<b>Manifestação clínica</b>	<b>Amostra biológica</b>
Eritema Migrans Primário	Biópsia da pele
Eritema Migrans Secundário	Sangue
Sintomas Neurológicos	Líquido cefaloraquidiano
Artrites	Fluido Sínovial

Assim sendo, numa fase inicial da doença a amostra mais sensível para análise de PCR é a biópsia de pele, mais especificamente do Eritema Migrans Primário. Contudo, a recolha desta amostra pode não ser feita de forma adequada, isto é, pode fazer-se a biópsia numa área cutânea em que a bactéria já não esteja presente. O ideal será sempre

fazer a análise no máximo número possível de amostras biológicas tendo sempre em conta as manifestações clínicas do doente. Numa fase final da doença a recolha de líquido sinovial, apesar de ser uma técnica invasiva, é a mais sensível se o doente já apresentar manifestações clínicas articulares (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Pensa-se que a bactéria possa ser excretada também através da urina, contudo o uso de tal amostra biológica para análise por PCR não é aconselhado visto não se saber ao certo em que fase da Borreliose de Lyme as bactérias são excretadas (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Depois de seleccionada a amostra correcta procede-se então a análise desta por PCR em que se vai amplificar o DNA da bactéria e detectá-lo por PCR recorrendo a *primers* específicos capazes de reconhecer as cadeias de DNA da bactéria (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

A eficiência de um ensaio por PCR é fortemente determinada pela selecção do “gene alvo” a ser amplificado, isto é, aquele que vai identificar a bactéria. Estes “genes alvo” são diferentes consoante a bactéria a detectar. A selecção do *primer* que vai hibridar com ele é também determinante (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Uma das vantagens dos métodos moleculares é que, como se faz a detecção directa do DNA da *Borrelia*, o início do tratamento não condiciona o resultado (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

#### **1.4. PCR**

A tecnologia de PCR foi concebida por Kary Mullis e desenvolvida por uma equipa de cientistas da *Cetus Corporation*, foi pela primeira vez publicada em 1985 e foi considerada como uma das mais poderosas ferramentas de biologia molecular. Trata-se de uma técnica de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA (Roche, 2003).

Na replicação do DNA, a dupla hélice desnatura originando duas cadeias separadas de

DNA que vão servir de molde para a formação de cadeias complementares. A replicação do DNA é semi-conservativa, cada cadeia filha recebe então, uma molécula da cadeia molde. É um processo complexo que envolve bastantes proteínas, de entre elas a DNA polimerase que é uma enzima responsável pela leitura das sequências das cadeias molde de DNA sintetizando e combinando a sua cadeia filha por complementariedade isto é, integrando os nucleótidos complementares nas cadeias molde (Roche, 2003).

Para a reacção de PCR ocorrer é necessário o DNA e uma mistura de reagentes fundamentais para a reacção – *Master Mix*.

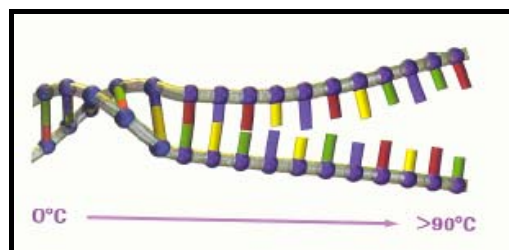
#### 1.4.1. *Master Mix*

A *Master Mix* tem como componentes essenciais a enzima (DNA polimerase) envolvida no processo de transcrição e replicação; *primers* que são sequências de oligonucleótidos com 18 a 30 pb (iniciadores da reacção); dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados); tampão que usualmente contém *tris*-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, BSA (*bovine serum albumine*) e detergentes não iónicos (Roche, 2003).

#### 1.4.2. Fases da reacção do PCR

##### 1.4.2.1. Primeiro passo: Desnaturação pelo calor

Neste passo dá-se a separação da dupla hélice de DNA (Fig. 2) por aquecimento a uma temperatura elevada (90-95°C) originando duas cadeias separadas (Roche, 2003).



#### **1.4.2.2. Segundo passo: *Annealing***

Depois da desnaturação do DNA, adiciona-se o par de *primers* que se recombina com as duas cadeias de DNA separadas. Esta recombinação é feita com elevada especificidade (Fig. 3). O par de *primers* liga-se exactamente à sequência complementar de DNA (Roche, 2003).

Os *primers* indicam os pontos inicial e final da nova cópia de DNA que irá ser sintetizada no passo seguinte (Roche, 2003).

#### **1.4.2.3. Terceiro passo: Extensão**

Uma vez feita a hibridação do *primer* à sequência complementar de DNA, a temperatura pode ser elevada até 72°C sendo a DNA polimerase usada para a replicação do DNA (Roche, 2003).

A DNA polimerase reconhece os sítios onde os *primers* se recombina com o DNA alvo e liga-se a eles. A enzima sintetiza então a cadeia complementar utilizando os nucleótidos trifosfatados que estão livres e em excesso na solução de reacção (dNTP's) (Roche, 2003).

A extensão começa sempre na zona 3' do *primer*. A DNA polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5'-3' (Fig. 4). Consequentemente, na construção da cadeia complementar da sequência alvo de DNA, os nucleótidos livres na solução são somente

adicionados à zona 3' dos *primers* (Roche, 2003).

A extensão do *primer* ocorre a 72°C que coincide com a temperatura a que a DNA polimerase tem o seu máximo de actividade (Roche, 2003).

O tempo de incubação varia consoante o comprimento da sequência alvo a ser amplificada (Roche, 2003).

#### **1.4.2.4.Fim do primeiro ciclo de PCR**

No fim de um ciclo de PCR obtém-se duas novas cadeias de DNA para cada alvo da dupla cadeia (Fig. 5). O produto da reacção por PCR é chamado de Amplicão.

A reacção de PCR origina assim aumentos de  $2^n$  cópias em que  $n$  é o número de ciclos realizados. Assim a PCR produz um aumento exponencial da região desejada (Fig. 6).

A capacidade de, através do processo de amplificação do PCR se detectar com elevada sensibilidade, cópias de sequências alvo é uma enorme vantagem desta reacção contudo, pode traduzir-se também numa desvantagem se não se tomarem certos cuidados na preparação e armazenamento das amostras com o objectivo de não ocorrerem contaminações. Os riscos de contaminação das amostras podem ser minimizados com certos procedimentos experimentais tais como o uso de controlos negativos, pré aliquotagem dos reagentes, uso correcto de pipetas nomeadamente pipetas com deslocamento positivo ou pontas com barreiras que evitem a contaminação. Separação da área de preparação da reacção da área de amplificação e da área de análise de produtos (Somma M, 2006).

A fim de se assegurar os resultados obtidos são necessários controlos internos para monitorizar a variabilidade dos ensaios aos quais podem ser atribuídas diferenças devido a componentes da reacção, inibidores de PCR, variações de técnico para técnico e dos instrumentos usados (Somma M, 2006).

Recentemente tornou-se também possível a detecção e quantificação dos produtos de PCR em tempo real utilizando fluorocromos que se ligam à dupla cadeia de DNA ou sondas fluorescentes específicas (Somma M, 2006).

### **1.5. PCR em tempo real (qPCR)**

A reacção de PCR em tempo real é baseada na detecção e quantificação de um sinal fluorescente proporcional à amplificação do produto do PCR convencional monitorizado em tempo real (Roche, 2003).

A detecção acumulada de produtos de PCR, ciclo após ciclo, é possível através da combinação de termocicladores, da detecção da fluorescência e de um *software* próprio (Roche, 2003).

Para além de se poder quantificar em tempo real o produto amplificado e da rapidez com que se obtêm os resultados o PCR em tempo real não necessita de qualquer passo pós-PCR (electroforese, digestão ou hibridação) o que minimiza a possibilidade de contaminação cruzada de produtos de PCR. Esta vantagem torna o PCR em tempo real, uma das tecnologias mais eficazes da biologia molecular na aplicação ao diagnóstico clínico (Roche, 2003).

O PCR em tempo real pode ser usado na análise da expressão genética, detecção de microorganismos patogénicos, reconhecimento de vírus e bactérias e discriminação alélica (Roche, 2003).

### **1.5.1. Métodos de detecção**

#### **1.5.1.1. *SYBR Green***

O formato de PCR em tempo real mais simples utiliza um corante específico do DNA em cadeia dupla – *SYBR Green*. Quando este corante está ligado ao DNA é excitável emitindo uma fluorescência proporcional à quantidade de DNA de cadeia dupla existente (Fig. 7). O facto do *SYBR Green* se ligar a todo o DNA de cadeia dupla confere-lhe pouca especificidade pois pode ocorrer amplificação de fragmentos não específicos. Assim sendo, um bom desenho dos *primers*, adquire aqui um papel fundamental na especificidade dos fragmentos a amplificar, sendo ainda mandatória a confirmação da especificidade dos resultados com uma análise da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) (Wittwer C, 2004).

#### **1.5.1.2. Sondas de hibridação ou sondas FRET**

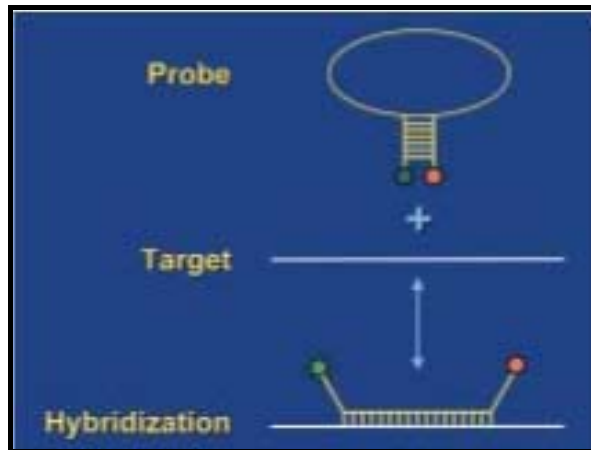
Este tipo de sondas possui um par de oligonucleótidos marcados. Um na extremidade 5' com um fluorocromo dador que, ao ser excitado, vai emitir energia. Esta energia é absorvida pelo fluorocromo repórter que se encontra na extremidade 3' do segundo oligonucleótido. Como este oligonucleótido hibrida muito próximo do primeiro, quando as sondas hibridam, os dois fluorocromos ficam próximos um do outro o que torna esta transferência de energia possível. Na ausência de hibridação não ocorre a transferência de energia pelo que, a fluorescência do fluorocromo repórter não é detectável (Fig. 8) (Reichl U, 2002).

### **1.5.1.3. Sonda *Molecular beacons***

Este tipo de sondas possuem uma molécula *quencher* na extremidade 5' e um repórter na 3' contudo apresentam uma estrutura secundária em forma de gancho de cabelo localizada na sequência da união com o DNA alvo específico (Roche, 2003).

Quando a sonda não se encontra hibridada, as extremidades encontram-se ligadas o que faz com que o *quencher* e o repórter se encontrem muito próximos impedindo a detecção de fluorescência emitida pelo repórter já que esta é absorvida pelo *quencher*.

Quando a sonda hibrida com o DNA alvo há uma abertura da sonda levando a um afastamento entre o *quencher* e o repórter sendo assim possível detectar a fluorescência emitida pelo repórter (Fig. 9) (Reichl U, 2002; Roche, 2003).



#### 1.5.1.4. Sondas *TaqMan*

Estas sondas possuem modificações nas duas extremidades. Um fluoróforo (repórter) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. O *quencher* é capaz de absorver a luz que o fluoróforo emite impedindo assim a sua detecção.

Quando a sequência é amplificada, a actividade exonucleolítica da polimerase degrada a sonda, separando o *quencher* do fluorocromo, permitindo a detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo (Fig. 10) (Wittwer C, 2004).

#### 1.5.2. Optimização de protocolos de PCR em tempo real

Existem vários parâmetros que podem influenciar uma reacção de PCR em tempo real.

Para otimizar a reacção temos de ter sempre em conta os parâmetros que influenciam o rendimento, a reprodutibilidade e a especificidade da reacção.

#### **1.5.2.1. Desenho dos *primers* e sondas**

Para obtenção de bons resultados nesta reacção, isto é, para que a reacção seja específica e sensível, é necessário que os *primers* e a sonda sejam bem desenhados.

Primeiro deve seleccionar-se a sonda e só depois deve desenhar-se os *primers*, o mais próximo possível de forma que os produtos do PCR não sejam grandes de mais (entre 100 e 250 pb). A temperatura de *melting* das sondas deve ser cerca de 8 a 10°C mais elevada que a dos *primers*. Não se deve terminar a extremidade 5' com uma guanina (G) pois pode dar origem ao efeito *quenching* (Innis MA, 1990).

No desenho dos *primers* deve ter-se especial atenção às últimas três bases para evitar que haja amplificação de produtos inespecíficos. Para tal a extremidade 3' não deve ter mais de duas citosinas (C) ou guaninas (G).

Quanto à concentração ideal de *primers* numa reacção deve andar entre os 0,1 e 0,5 µM. Elevadas concentrações de *primers* diminuem o rendimento da reacção favorecendo a formação de *primer-dimer* (Innis MA, 1990).

A temperatura de *melting* para os dois *primers* deve ser semelhante e deve andar entre os 55 e os 80°C contudo, varia conforme a composição dos *primers*. Esta temperatura é calculada através da fórmula termodinâmica que provém da estabilidade que se adquire ou não com os oligonucleótidos. Hoje em dia, esta fórmula é calculada por um *software* de desenho de *primers* (Wittwer K, 2004).

#### **1.5.2.2. Desoxirribonucleotídeos Fosfatados dNTPs**

A concentração de dNTPs a que se obtém um maior rendimento e especificidade deve andar entre os 20 e 200 µM. Os quatro nucleótidos devem conter a mesma concentração

para que não hajam erros de incorporação. As elevadas concentrações de dNTPs normalmente aumentam este tipo de erros, já concentrações demasiado baixas diminuem o rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

### **1.5.2.3. Taq polimerase**

A concentração de enzima ideal para protocolos otimizados deve andar ente 1 e 2,5 U/100 µL de reacção. Quando se está a otimizar um protocolo aconselha-se que se teste a enzima entre 0,5 e 5 U/100 µL de reacção e se verifique os resultados num gel de electroforese.

Elevadas concentrações da enzima podem originar fragmentos não específicos já as baixas concentrações diminuem o rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

### **1.5.2.4. Tampão**

O tampão aconselhado para PCR deve conter entre 10 a 50 mM de *Tris-HCl*; KCl tendo em atenção que concentrações superiores a 50 mM podem inibir a actividade da Taq polimerase; aproximadamente 100µg/ml de BSA (*bovine serum albumine*) e entre 0,05 a 0,1% de detergentes não iónicos (*Tween 20*, por exemplo) que ajudam a estabilizar a Taq polimerase. Habitualmente as soluções tampão já costumam conter 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> visto ser o parâmetro mais importante para a especificidade e rendimento da reacção (Innis MA, 1990).

### **1.5.2.5. MgCl<sub>2</sub>**

A concentração de MgCl<sub>2</sub> pode afectar desde o *annealing* dos *primers*, temperatura de dissociação das cadeias, a especificidade do produto, formação de *primer-dimer* e a actividade e fidelidade da Taq polimerase (Innis MA, 1990).

A concentração ideal de  $MgCl_2$  é variável devendo iniciar-se com uma concentração de 1,5 mM (normalmente já incluída no tampão). Um excesso de concentração pode traduzir-se na acumulação de produtos inespecíficos enquanto que uma diminuição está muitas vezes associada a uma diminuição do rendimento da reacção.

A presença de agentes quelantes (ex. EDTA) nos *primers* e no DNA alvo pode causar oscilações na concentração óptima de magnésio (Innis MA, 1990). A concentração de dNTPs deve ser determinada em conjunto com a titulação de magnésio para que haja um rendimento óptimo da reacção (Persing DH, 1993).

#### **1.5.2.6. Ciclos: número, tempo e temperaturas nas diferentes fases**

O número, tempo e temperaturas das diferentes fases dependem do equipamento que se usa, dos *primers*, da composição dos fragmentos a amplificar e até dos tubos utilizados.

As condições típicas de desnaturação são de 94°C contudo, esta temperatura pode aumentar para produtos com elevada predominância de guaninas (G) e citosinas (C). Tempos longos e temperaturas elevadas de desnaturações podem afectar a actividade da Taq polimerase. Pelo contrário, tempos curtos e temperaturas baixas, dão origem a uma desnaturação insuficiente traduzindo-se num baixo rendimento de reacção (Roche, 2003).

A temperatura ideal de *annealing* dos *primers* varia consoante a temperatura de *melting* dos *primers* e das sondas. Por norma, esta temperatura deve ser inferior cerca de 5°C da temperatura de *melting*. Esta temperatura tem grande impacto na especificidade da reacção. Por norma, o seu aumento traduz-se numa maior especificidade da reacção contudo, pode acarretar uma diminuição de rendimento e consequente reprodutividade (Witter C, 2004).

O tempo de extensão dos *primers* varia consoante o tamanho da sequência que se pretende amplificar. Por norma 15-30 segundos a uma temperatura de 72°C são suficientes para a extensão de produtos abaixo de 1000 pb nos equipamentos *fast-cycling*. Nos equipamentos mais lentos a extensão dos *primers* pode durar 1-2 minutos.

Considerando que todos os outros parâmetros se encontram otimizados, o número ótimo de ciclos varia em função da concentração inicial do DNA. Um excesso de ciclos pode levar a um aumento de produtos inespecíficos ao contrário. Pelo contrário, uma diminuição pode levar a um decréscimo do rendimento da reacção. Nos equipamentos *fast-cycling*, em média 30-50 ciclos de amplificação requerem apenas entre 30 a 40 minutos (Witter C, 2004).

### **1.5.3. Reacção *multiplex***

Nesta reacção são utilizados múltiplos pares de *primers* para amplificar várias sequências em simultâneo (Persing DH, 1993).

A junção de vários pares de *primers* num único tubo pode causar vários problemas tais como, a formação de amplicões inespecíficos; *primer-dimer* e a amplificação de mais fragmentos de DNA que não o “alvo” (Persing DH, 1993).

A escolha dos *primers* é feita de modo a que a temperatura de *annealing* e o comprimento dos produtos a amplificar sejam similares.

Para diminuir a competitividade entre os amplicões e a discriminação de grandes fragmentos de DNA, os tampões usados neste tipo de reacção já possuem Taq polimerase.

Os produtos obtidos na reacção *Multiplex* podem ser hibridados com uma sonda específica do gene para confirmação (Somma M, 2006).

### **1.5.4. Detecção/Quantificação em LightCycler**

O número de cópias da sequência alvo de DNA amplificada pode ser determinado pela caracterização da relação dinâmica entre os ciclos de amplificação de PCR e a formação de produtos de PCR (Roche, 2003).

O PCR em tempo real permite uma quantificação de DNA mais precisa e reprodutível do que os outros métodos pois tem como base a medida determinada desde a fase inicial até ao ponto final (Roche, 2003).

Os valores da intensidade fluorescente são registados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto que é produzida em cada ciclo. É assim produzida uma curva de crescimento da amplificação obtida com os valores da intensidade de fluorescência e o número de ciclos (Roche, 2003).

A intensidade de fluorescência emitida durante os primeiros ciclos vai definir os valores da linha de base (Fig. 11). O aumento desta intensidade de fluorescência acima da linha de base indica a detecção de produtos de PCR acumulados (Roche, 2003).

A fracção do número de ciclos em que a intensidade de fluorescência supera o nível de fluorescência atribuído é denominada, Ct (*Cycle threshold*) (Fig. 11). O valor de Ct é então, o número de ciclos a que a reacção alcança um crescimento significativo de fluorescência acima da linha de base. Este crescimento ocorre quando há um aumento de detecção de sinal fluorescente pelos receptores associado ao crescimento exponencial de produtos de PCR. O valor de Ct no gráfico de resultados encontra-se situado no início da curva de crescimento (Fig. 11) (Roche, 2003).

Nos ciclos finais da reacção de PCR ocorre uma atenuação da taxa exponencial da acumulação de produto conhecida como efeito *Plateau* (Fig. 11). Existem diversas causas que podem influenciar o efeito *Plateau* como a reassociação dos produtos que podem competir com o *annealing* dos *primers*, a perda de actividade da polimerase que se torna limitante, acumulação de inibidores da polimerase e de produtos secundários da reacção (ex. pirofosfato), a estabilidade dos reagentes, entre outras (Wittwer C, 2004).

## 1.6. Objectivos

O objectivo deste trabalho consistiu em criar um método rápido, sensível, específico e não influenciado pela terapêutica para detecção dos vários géneros de *Borrelia burgdorferi* s.l. nas diferentes áreas geográficas.

Dentro dos métodos de diagnóstico optou-se pelos da biologia molecular pois, são os que, reúnem as condições supracitadas, mais especificamente o método de detecção do DNA da *Borrelia burgdorferi* s.l. através da reacção de PCR em tempo real.

Optou-se pela escolha do PCR em tempo real pois comparativamente com o PCR este é um ensaio mais reprodutível, apresenta ao mesmo tempo um maior número de espécies de *Borrelia* num menor número de ciclos de amplificação sendo ainda capaz de fazer a detecção sem que para isso, seja necessário o uso de técnicas complementares de detecção como por exemplo, a electroforese.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Foram utilizadas amostras de DNA obtidas de blocos de parafina, e previamente extraídas na Unidade de Biologia Molecular do Hospital Geral de Santo António. Foram utilizadas no trabalho 4 amostras que previamente tinham revelado não possuir DNA de *Borrelia burgdorferi*, enquanto 6 amostras se tinham revelado positivas para o DNA desta bactéria.

As amostras de DNA foram sempre preservadas a -20°C.

Como controlo negativo (Non-template-control) foi utilizada água isenta de DNases (Molecular Biology Grade, Promega, USA).

### **2.2. Extracção de DNA de peças em parafina**

A extracção de DNA foi executada a partir de 10 a 15 cortes a 10 µm de blocos de parafina, correspondentes a cerca de 2 mg de biópsia. O tecido foi extraído recorrendo ao *kit* de extracção de tecidos do EZ1 (Qiagen, Alemanha), utilizando um pré-tratamento a 56°C durante a noite em tampão de digestão e proteinase K (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A amostra digerida foi

posteriormente separada do tecido não digerido por centrifugação, e aplicada no equipamento de extração automática EZ1 (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.3. *Primers* e sonda para a detecção do Gene 16S rRNA

Para desenho dos *primers* e sonda Taqman específicos para o gene 16S de *Borrelia burgdorferi*, foi utilizado o programa Allele ID (Versão 2.0). No desenho dos *primers* foi considerado particularmente importante que estes fossem específicos para a amplificação de todas as espécies de *Borrelia burgdorferi* patogénicas bem como para *Borrelia lusitânia*, cuja patogenecidade é ainda controversa, mas que pode ter particular importância na Península Ibérica (Aguero-Rosenfeld ME, 2005).

Os oligonucleótidos desenhados (*primers* e sondas) estão listados na tabela 3, tendo sido sintetizados pela *Biochem* (USA).

Tabela 3 – Sequência da sonda *Taqman* e dos *primers* desenhados.

Nome	Sequência	Tm (°C)	Tamanho	Obs
Borr16sP	AGTGTCGCTCCGTCAGGCTTTCGC	68.3	24	<i>TET probe</i>
Borr16s1s	AGATACGGTCCAGACTCCTACG	59	22	<i>Sense primer</i>
Borr16s2a	ATCTTTCGACCTTCTTCATTCACG	58.3	24	<i>Antisense primer</i>

### 2.4. Amplificação do Gene 16S rRNA

A amplificação foi realizada no Termociclador-em-Tempo-Real LightCycler (Roche). Este equipamento, sendo o termociclador comercial mais rápido disponível neste momento, permite o desenvolvimento de um protocolo extremamente rápido, específico

e sensível.

No protocolo inicial foi utilizada uma mistura de reacção com concentrações equimolares dos 2 *primers* (1.0  $\mu$ M), 0.2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3  $\mu$ M de sonda Taqman e 0.05 U de JumStart Taq DNA polimerase (Sigma, USA) utilizando ainda o tampão de reacção fornecido com a enzima, e 5 $\mu$ l de DNA ou non-template-control num volume total de reacção de 20 $\mu$ l.

Esta mistura de reacção foi então submetida a variações térmicas programadas em capilares de 20  $\mu$ l do LightCycler. O programa térmico consistiu num passo inicial de activação enzimática a 95°C durante 60 segundos, seguido de 50 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação foi realizado com um passo de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, seguido da fase de *annealing* dos *primers* e sonda a 52°C durante 20 segundos e finalmente a fase de extensão a 68°C durante 20 segundos. Em todas as variações térmicas foi utilizada a máxima velocidade disponível (20°C/s). A variação de temperatura entre os passos de hibridação e de amplificação foi limitada a 5°C/segundo para permitir o início da reacção antes da temperatura óptima de polimerização ter sido atingida, o que aumenta a estabilidade dos *primers* a esta temperatura. No final da amplificação o aparelho foi estabilizado a 40°C durante 30 segundos.

Foram testadas diferentes variáveis listadas na tabela 4, nas permutações possíveis das condições listadas na mesma tabela até se chegar a um protocolo optimizado.

Tabela 4 – Lista das condições testadas para a otimização do protocolo de amplificação do Gene 16S rRNA de *Borrelia burgdorferi*.

Variações de concentração			Variações de Tempo nas fases do PCR			Variações de Temperatura		Variações de “ramping”	
<i>Primer sense</i> ( $\mu$ M)	MgCl <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	dNTP (mM)	desnat. (seg)	Anneal (seg)	Extensão (seg)	Anneal (°C)	Extensão (°C)	Anneal extensão (°C/s)	Extensão/ extensão <sup>a)</sup> (°C/s)
0.5	3.0	0.2	5	10	20	52°C	68°C	5	5
0.7	3.5	0.4	10	20	40	54°C	60 e 68 <sup>a)</sup>	20	
0.8	4.0				20+20 <sup>a)</sup>	56°C	72°C		
0.9	4.5								
1.0	5.0								
	5.5								
	6.0								
	6.5								
	7.0								

a) Foi ensaiado um protocolo em que se realizaram 2 passos de extensão a 2 temperaturas diferentes.

## **2.5. Análise dos produtos de PCR**

### **2.5.1. LightCycler**

Em Tempo Real, os produtos de amplificação foram detectados no LightCycler observando a fluorescência detectável no canal 1, a qual é directamente proporcional à quantidade de fluorocromo (TET) libertada pela actividade exonucleolítica da Taq polimerase e portanto, directamente proporcional à quantidade de amplicões específicos produzidos na reacção.

Como medida da sensibilidade, foi registado o *cycle threshold* (Ct), isto é, o ciclo calculado no qual se inicia a detecção da fase exponencial da amplificação. Este valor é em condições optimizadas inversamente proporcional à quantidade de DNA alvo existente na amostra, pelo que durante a optimização das condições de amplificação, uma diminuição do Ct corresponde a um aumento de sensibilidade.

### **2.5.2. Electroforese**

#### **Gel de agarose**

Usou-se uma tina de electroforese (Bio-RAD, Mini-BUB<sup>®</sup> CELL GT) com tampão TBE (BioRad) onde se adicionou 10 µL de produto de PCR a cada poço do gel (4% Nusieve 3:1; 8 poços com brometo de etidium, FMC). Foram usados dois marcadores moleculares diferentes, um de 100 pb (GeneRuler<sup>™</sup> DNA Ladder Mix Fermentas, USA) e outro de 50 pb (BioLabs, USA).

#### **Chip de DNA**

Usou-se o Agilent 2100 Bioanalyzer (Caliper, USA) em chip de DNA – DNA 1000 LabChip Kit (Agilent Technologies) que usa um sistema de electroforese capilar em *microchip*.

O produto de PCR é corrido juntamente com um marcador de peso molecular e de massa que permite quantificar a massa e determinar o tamanho dos amplicões com grande rigor.

### 3. RESULTADOS

Para obtenção dos resultados que se seguem foram utilizados 5 µl de NTC (H<sub>2</sub>O livre de DNAses) e 15µl da *master mix* que teve início com concentrações equimolares dos dois *primers* (16s1s e 16s2a) de 1 µM, 0,3 µM de sonda, 0,2 mM de dNTPs (BioRon, Alemanha), 0,05U de enzima JumpStart (Sigma, USA) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma, USA). A activação enzimática foi feita a 94°C durante 60 segundos e a amplificação realizou-se durante 50 ciclos. Cada ciclo de amplificação foi composto por um passo de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, *annealing* a 52°C durante 20 segundos e extensão a 68°C durante 20 segundos. Finalmente, a temperatura foi estabilizada do aparelho a 40°C durante 30 segundos. Em todas estas variações térmicas usou-se variações máximas de 20°C/s. Com o decorrer dos seguintes ensaios foram testadas variações a estas condições iniciais que deram origem a resultados diferentes, os quais se encontram descritos na tabela 5.

No primeiro ensaio, testaram-se nas condições referidas três amostras: uma NTC, uma amostra negativa e uma positiva. No decorrer dos resultados, foram sendo acrescentadas novas amostras. Os resultados obtidos foram concordantes com o estado de positividade das amostras como se pode ver na figura 12 e na tabela 5.

Apesar dos resultados de Ct obtidos serem concordantes com a positividade das amostras, o gráfico dos resultados apresentou um intervalo de fluorescência muito baixo (Fig. 12). Como tal, nos seguintes ensaios (2 e 3) optou-se por aumentar a concentração de MgCl<sub>2</sub> para 3,0 e 4,0 mM. Os resultados obtidos estão descritos na figura 13 e na tabela 5.

Tabela 5: Sumário das condições testadas e dos respectivos resultados (Ct) observados

n.º	Variáveis introduzidas								Ct obtido para cada amostra										
	n.º ciclos	[MgCl <sub>2</sub> ]	[dNTPs]	[16s2a]	Desnaturação	Annealing	Extensão	Outros	H <sub>2</sub> O	2	101	102	8	972268	103	104	105	106	9822869
					T(°C);Te(s);R(°C/s)	T(°C);Te(s);R(°C/s)	T(°C);Te(s);R(°C/s)		NTC	N	P	P	N*	N	P	P	P	P	N
1	50	1,5	0,2	1,0	95; 10; 20	52; 20; 20	68; 20; 20	[16sP]:0,3µM; [Enz]:0,05U/r.	nd	nd	32,72	-	-	-	-	-	-	-	-
2	=	3,0	=	=	=	=	=	=	nd	nd	33,31	-	-	-	-	-	-	-	-
3	=	4,0	=	=	=	=	=	=	25,42	nd	29,65	31,65	-	-	-	-	-	-	-
4	=	3,0	=	=	=	=	68; 20; 5	=	nd	nd	31,09	31,37	-	-	-	-	-	-	-
5	=	=	=	=	=	=	68; 40; 5	=	nd	nd	32,69	-	-	-	-	-	-	-	-
6	=	=	=	=	=	=	60;20;5/68;20;5	=	nd	28,81	31,56	-	-	-	-	-	-	-	-
7	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	nd	-	-	nd	-	-	-	-	-
8	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	34,84	-	-	nd	-	-	-	-	-
9	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	nd	-	29,75	nd	-	-	-	-	-
10	=	=	=	=	=	=	68; 40; 5	=	nd	-	-	-	30,26	nd	29,26	-	-	-	-
11	=	=	=	=	95; 5; 20	=	=	=	nd	-	-	-	32,19	nd	-	-	-	-	-
12	=	=	=	=	=	52; 10; 20	=	=	nd	-	-	-	8,15	nd	-	-	-	-	-
13	60	=	=	=	=	52; 20; 20	=	=	nd	-	-	-	-	nd	32,62	-	-	-	-
14	=	=	=	=	=	=	68; 30; 5	=	nd	-	-	-	-	nd	30,41	-	-	-	-
15	=	=	=	=	=	=	72; 30; 5	=	21,62	-	-	-	-	34,29	40,37	nd	-	-	-
16	=	=	=	=	=	=	68; 30; 5	=	nd	-	-	-	-	33,78	44,88	30,90	-	-	-
17	=	=	=	=	=	=	=	=	39,60	-	-	-	29,89	29,46	29,88	-	-	-	-
18	50	3,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	29,28	nd	28,79	-	-	-	-
19	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	28,87	nd	29,84	-	-	-	-
	=	4,0	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	28,68	nd	nd	-	-	-	-
20	=	4,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	29,70	nd	30,94	-	-	-	-
	=	5,0	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	nd	nd	29,76	-	-	-	-
21	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	26,69	nd	-	nd	-	-	-
	=	5,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	26,69	nd	-	26,48	-	-	-

Tabela 5: Sumário das condições testadas e dos respectivos resultados (Ct) observados (cont.)

n.º	Variáveis introduzidas								Ct obtido para cada amostra										
	n.º ciclos	[MgCl <sub>2</sub> ]	[dNTPs]	[16s2a]	Desnaturação	Annealing	Extensão	Outros	H <sub>2</sub> O	2	101	102	8	972268	103	104	105	106	9822869
					T(°C);Te(s);R(°C/s)	T(°C);Te(s);R(°C/s)	T(°C);Te(s);R(°C/s)		NTC	N	P	P	N <sup>o</sup>	N	P	P	P	P	N
22	=	5,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	28,36	26,37	-	29,50	-	-	-
	=	6,0	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	nd	nd	-	nd	-	-	-
	=	6,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	28,51	nd	-	nd	-	-	-
23	=	5,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	nd	nd	-	-	nd	nd	-
24	=	5,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	26,09	nd	-	26,24	26,95	nd	-
	=	6,0	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	29,60	nd	-	30,04	29,32	29,91	-
25	=	6,5	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	nd	-	-	30,53	-	-
	=	7,0	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	nd	-	-	33,00	-	-
26	=	6,5	=	0,5	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	nd	-	-	28,49	-	-
27	=	=	=	0,9	=	=	=	=	30,87	-	-	-	-	29,28	-	-	33,65	-	-
	=	=	=	0,8	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	37,86	-	-	37,61	-	-
	=	=	=	0,7	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-	-
28	=	=	=	1,0	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd
	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	-	28,74	-	nd
29	=	3,0	0,4	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	31,19	-	-	-
	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	29,78	-	-	-
	=	3,5	0,4	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	30,00	-	-	-
30	50	3,0	0,4	1,0	95; 5; 20	54; 20; 20	68; 30; 5	=	nd	-	-	-	-	-	-	31,45	-	-	-
	=	=	=	=	=	=	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	31,86	-	-	-
31	=	3,0	=	=	=	56; 20; 20	=	=	nd	-	-	-	-	-	-	32,10	-	-	-
	=	=	=	=	=	=	=	=	32,74	-	-	-	-	-	-	33,02	-	-	-

Como no ensaio 3 se obteve um falso positivo para o NTC com uma concentração de 4,0mM de MgCl<sub>2</sub>, nos ensaios 4 e 5, voltou-se a concentrações de 3,0mM. No ensaio 4 diminuiu-se a velocidade de extensão para 5°C/s e no ensaio 5 aumentou-se o tempo de extensão para 40 segundos (Fig. 14, tabela 5).

O intervalo de fluorescência dos gráficos até aos ensaios realizados não aumentou significativamente. Para além disso, o Ct da amostra 101 aumentou nestes dois últimos ensaios pelo que, nos ensaios 6, 7, 8 e 9, se optou por dividir a fase de extensão em duas fases. A primeira fase com uma temperatura de 60°C e a segunda a 68°C ambas durante 20 segundos e a uma velocidade de 5°C/s. Nestes ensaios foram testadas diferentes amostras como descrito na tabela 5 (Fig. 15).

Como se pode constatar os resultados destes quatro ensaios, apesar de se encontrarem nas mesmas condições não são concordantes tanto em termos de positividade das amostras como entre eles. Quanto à não concordância da positividade das amostras verifica-se que no ensaio 6, a amostra 2 apresenta um falso positivo e a amostra 101 revela falsos negativos nos ensaios 7 e 9. A não concordância entre os ensaios, também é visível pela comparação da amostra 101, que em dois dos ensaios é positiva e noutros dois é falsamente negativa. Há também uma elevada divergência do nível de fluorescência de uns ensaios para os outros (fig. 15).

Constatada a não concordância de resultados nestes quatro ensaios, no ensaio 10 optou-se por voltar novamente a um passo de extensão a 68°C durante 40 segundos e a uma velocidade de 5°C/s. Os resultados foram novamente concordantes com a positividade das amostras como se pode ver tanto na figura 16 como na tabela 5.

Apesar dos resultados serem concordantes em termos de positividade das amostras verifica-se no gráfico (Fig. 16) um ligeiro aumento tanto do NTC como da amostra negativa. No ensaio seguinte, ensaio 11, diminuiu-se o tempo de desnaturação para 5 segundos. Os resultados foram novamente concordantes com a positividade das amostras (Fig. 17, tabela 5).

Embora neste ensaio se tenha observado um ligeiro aumento do Ct da amostra 8, desapareceu a mesma tendência que anteriormente se observava no NTC e na amostra 972268.

Seguidamente no ensaio 12, tentou reduzir-se o tempo de *annealing* para 10 segundos mas como se obteve um Ct na amostra 8 bastante diferente do que se tem vindo a obter e não explicável pela redução do tempo de *annealing* (Fig. 18, tabela 5), no ensaio 13 optou-se por voltar a um tempo de *annealing* de 20 segundos aumentando aqui também o

número de ciclos para 60 (Fig. 18, tabela 5).

Nestes dois últimos ensaios assistiu-se a uma diminuição do intervalo de fluorescência. Nos seguintes ensaios, ensaio 14 e 15, voltou a testar-se parâmetros da extensão para tentar melhorar o intervalo de fluorescência bem como baixar o Ct das amostras. Assim, no ensaio 14 diminuiu-se o tempo de extensão para 30 segundos e no ensaio 15 aumentou-se a temperatura para 72°C (tabela 5). Os resultados no ensaio 14 foram concordantes com a positividade das amostras. O mesmo já não acontece no ensaio 15, como se pode verificar na figura 19, tabela 5.

Uma vez que o ensaio 15 não levou a melhoria de resultados, pelo contrário houve aparecimento de falsos positivos, nos seguintes ensaios, ensaio 16 e 17, optou-se por voltar a uma temperatura de extensão de 68°C (tabela 5). Os resultados continuaram a apresentar falsos positivos como se pode ver na figura 20, tabela 5.

No ensaio 18, voltou-se a reduzir o número de ciclos para 50 e a testar uma nova concentração de MgCl<sub>2</sub> de 3,5 mM (tabela 5). Os resultados foram concordantes com a positividade das amostras contudo o NTC e a amostra negativa tendem sempre a aumentar não chegando a amplificar como se pode ver na figura 21.

Nos seguintes ensaios, do ensaio 19 até ao 25, testaram-se variações de concentração de  $MgCl_2$  entre os 3,5 e os 7,0 mM. Nestes ensaios, ocorreram muitas discordâncias quer na positividade das amostras quer nos Cts entre amostras iguais em condições iguais. Houve também bastantes variações no intervalo de fluorescência dos diversos ensaios (tabela 5, gráficos no anexo I). Foi então seleccionado o ensaio 25 por ser o que reuniu uma melhor combinação de resultados. Neste ensaio foram testadas concentrações de  $MgCl_2$  de 6,5 e 7,0 mM contudo, os melhores resultados verificaram-se a 6,5 mM (Fig. 22).

Posteriormente tentou reduzir-se as interferências observadas na figura 22 nomeadamente, a ligeira subida final do NTC e da amostra negativa testando-se nos seguintes ensaios concentrações menores do *primer anti-sense* 16s2a (tabela 5). Assim sendo, no ensaio 26 testou-se uma concentração de 0,5  $\mu M$  do *primer* 16s2a. Os resultados foram concordantes quanto à positividade das amostras (Fig. 23).

Verifica-se neste ensaio uma diminuição do Ct da amostra 105 comparativamente com o ensaio anterior em que a concentração do *primer* 16s2a era de 1,0  $\mu$ M contudo, o NTC e a amostra negativa continuam a apresentar uma ligeira subida. Foram então testadas, no ensaio 27, concentrações de 0,9; 0,8 e 0,7  $\mu$ M do *primer* (tabela 5) com a finalidade de melhorar os resultados. Tal não aconteceu, os resultados obtidos pioraram. Para além do aumento do Ct da amostra 105 a maior parte dos resultados não foi concordante com a positividade das amostras (ver gráficos no anexo I). No ensaio seguinte, ensaio 28, fez-se um duplicado com concentrações do *primer* 16s2a de 1,0  $\mu$ M. Contudo, os resultados não foram concordantes entre os duplicados e na positividade das amostras (Fig. 24).

Uma vez que os resultados obtidos no ensaio anterior não foram concordantes, no ensaio 29, optou-se por fazer um duplicado com o NTC e uma amostra positiva (104) em que se testou variações de concentração de MgCl<sub>2</sub> de 3,0 e 3,5 mM e se aumentou a concentração de dNTPs para 0,4 mM (tabela 5). Os resultados obtidos não foram concordantes com a positividade das amostras para concentrações de MgCl<sub>2</sub> de 3,5 mM como se pode ver na figura 25.

No ensaio seguinte, ensaio 30, optou-se por repetir o ensaio 29 com concentrações de MgCl<sub>2</sub> de 3,0 mM, pois das duas concentrações esta foi a que apresentou resultados mais concordantes. Aumentou-se a temperatura de *annealing* para 54°C para tentar obter melhores resultados (tabela 5). Os resultados em duplicado foram concordantes a nível de positividade das amostras e com um Ct da amostra positiva muito parecido como se pode ver na figura 26.

Com o aumento da temperatura de *annealing* no ensaio anterior os resultados foram concordantes a nível de positividade das amostras e com um Ct muito parecido. No ensaio seguinte (ensaio 31) aumentou-se novamente a temperatura de *annealing* para 56°C para verificar se haveria melhoria dos resultados (tabela 5, gráfico em anexo). Os

resultados não apresentaram melhoria pelo contrário, apresentaram uma não concordância na positividade das amostras bem como um aumento do Ct da amostra positiva.

Deste modo, o ensaio 30 foi de todos os ensaios realizados, em que se testaram inúmeras variações, o que reúne o maior número de concordâncias sendo neste trabalho, considerado o ensaio otimizado.

#### **4. DISCUSSÃO**

O Objectivo do trabalho aqui relatado consistiu em desenvolver um protocolo experimental para a rápida, sensível e específica detecção de *Borrelia burgdorferi* patogénicas. O trabalho iniciou-se com o desenho dos *primers* e sondas, e desde o início ficou patente o grande desafio presente. O desenho de sondas e *primers* compatíveis com todas as espécies patogénicas incluindo as potencialmente patogénicas como a *Borrelia lusitanea* revelou-se extremamente difícil, pelo que foi necessário fazer alguns compromissos como a aceitação de uma baixa temperatura de *annealing* (54°C), e a existência de homologia parcial com sequências humanas (Fig. 27). Estes compromissos, apesar de tornarem o desenho possível, foram determinantes para todo o resto do trabalho, por um lado limitando a gama de condições experimentais trabalháveis, e por outro aumentando a dificuldade de nas condições experimentais utilizáveis se obter os níveis de especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade necessários.

No entanto, os *primers* e sonda desenhados não apresentaram homologia significativa com bactérias não Borrelias revelados por Blast à base de dados limitada a sequências de bactérias, mas revelaram elevada homologia com as sequências de borrelia disponíveis (Fig. 28).

Desde o primeiro ensaio até ao protocolo neste estudo considerado otimizado muitas variáveis foram testadas. Dada a natureza recursiva do processo, e a interdependência das variáveis a otimizar, verificaram-se progressos e recuos ao longo dos ensaios. No fim de

vários ensaios e várias variáveis testadas considerou-se como protocolo otimizado o ensaio 30 (tabela 5, Fig. 26). Neste ensaio usou-se uma *master mix* com concentrações equimolares dos dois *primers*, 16s1s e 16s2a (BioChem, USA), de 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M de sonda, 16sP (BioChem, USA), 0,4 mM de dNTPs (BioRon, Alemanha), 0,05U de enzima JumpStart (Sigma, USA) e 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma, USA). A activação enzimática foi feita a 94°C durante 60 segundos e a amplificação realizou-se durante 50 ciclos. Cada ciclo foi composto por um passo de desnaturação a 95°C durante 5 segundos, *annealing* a 54°C durante 20 segundos e extensão a 68°C durante 30 segundos. Em todas estas variações térmicas usou-se a velocidade máxima de 20°C/s. Finalmente a temperatura do aparelho foi estabilizada a 40°C durante 30 segundos (Fig. 28, tabela 5).

Ao longo destes ensaios verificou-se uma certa dificuldade no que diz respeito à estabilização de um protocolo. Observou-se o aparecimento de falsos positivos, falsos negativos e os Cts das amostras variaram amplamente havendo mesmo ensaios em que, nas mesmas condições e com as mesmas amostras se observaram resultados diferentes (ex: ensaio 16 e 17; tabela 5). Esta instabilidade de resultados ao longo dos ensaios levou a crer que poderia haver algum tipo de contaminação ou degradação ao nível de reagentes, *primers* ou sonda. Por conseguinte no fim do ensaio 29, em que se fez duplicados das amostras e os resultados destes não foram concordantes, optou-se por preparar novas soluções de trabalho quer de *primers*, sonda, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs. Mudou-se também a água usada para a *mix*. Nesta fase verificou-se um precipitado na solução stock dos *primers*. Tal facto sugeriu logo que a instabilidade ao longo dos ensaios pudesse advir deste precipitado. Optou-se então por fazer um teste de reprodutibilidade em que foram usados *primers* de outro fornecedor (Operon Biotechnologies GmbH, Germany). O ensaio de reprodutibilidade consistiu em fazer uma *mix* nas mesmas condições do ensaio 30 (tabela n.º 5) com estes novos *primers* com volume suficiente para aliquotar, congelar e testar em dois dias distintos. O teste foi realizado em triplicado para o NTC e uma amostra positiva (amostra 8) e os resultados dos dois dias foram concordantes quer em termos de positividade das amostras quer em termos de Ct (Fig. 29).

Neste ensaio de reprodutibilidade observou-se uma perfeita concordância nos resultados obtidos, tanto no que respeita ao estado de positividade/negatividade da amplificação, como nos Ct observados. As variações entre Ct observadas foram inferiores a 0,2 ciclos,

tanto na variação interna dos ensaios, quanto na variação entre ensaios (Fig. 29). Também a intensidade de fluorescência observada, foi muito mais satisfatória com os novos reagentes do que com os reagentes anteriores, verificando-se ainda uma melhor intensidade no segundo ensaio, o que se pode dever a uma mais eficiente homogeneização da mistura de reacção no ensaio pós congelação da mistura.

Tornou-se assim aparente que parte significativa do esforço de optimização desenvolvido ficou comprometida por uma possível qualidade deficiente dos *primers* inicialmente utilizados. Estes resultados sugerem também que a falta de concordância dos resultados obtidos durante a fase de desenvolvimento pode dever-se a instabilidade nos *primers* utilizados durante esta fase, explicando-se assim os resultados por vezes discrepantes obtidos quer numa mesma experiência, quer em experiências diferentes mas com condições análogas. Estes resultados aconselham por isso que os resultados obtidos durante a fase de desenvolvimento sejam agora parcialmente reproduzidos com os novos reagentes. No entanto, por razões de calendário, não foi possível confirmar os resultados obtidos com os novos reagentes a tempo de incluir os resultados no presente trabalho, pelo que tal tarefa será realizada fora do contexto da presente monografia. Após essa confirmação, será ainda necessário realizar novos estudos para validação do ensaio, nomeadamente estudos de especificidade dos resultados, utilizando amostras positivas para outras bactérias que não *Borrelia burgdorferi*. Finalmente, será ainda desejável

avaliar a sensibilidade analítica e sensibilidade clínica do ensaio desenvolvido, utilizando amostras bacterianas quantificadas, e amostras com diagnóstico clínico pré-estabelecido pelos métodos correntemente utilizados.

Em conclusão, o trabalho desenvolvido permitiu chegar a um protocolo que de acordo com os resultados obtidos se revelou eficaz e reprodutível, faltando no entanto avaliar a especificidade e sensibilidade do ensaio. Os resultados preliminarmente obtidos durante a fase de desenvolvimento parecem sugerir que o ensaio é específico, o que conjuntamente com os dados do Blast parece sugerir igualmente uma especificidade adequada. Também a sensibilidade avaliada pelos resultados com amostras clínicas obtidos durante a fase de desenvolvimento parecem sugerir uma sensibilidade adequada ao objectivo do ensaio. No entanto só resultados sistemáticos poderão confirmar ou não estes resultados preliminares, validando ou não o protocolo otimizado no presente trabalho.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical*

*Microbiology Reviews* 2005 July; 18(3)

Collares-Pereira M, Couceiro S, França I, et al. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology* 2004 Mar; 42(3)

Derdáková M, Lencáková D. Association of Genetic Variability Within the *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato With the Ecology, Epidemiology of Lyme Borreliosis in Europe. *AAEM* 2005; 12,165-172

Ferreira WFC, Sousa JCF, editors. *Microbiology*: volume 2. Lisboa: Lidel; 2000.

Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O and Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. Nov. by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997 Oct; 47(4).

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc, 1990.

Mewer S, Wittwer C, Nakagawara Kan-ichi. *Rapid Cycle Real-Time-PCR: Methods and Applications*. New York: Springer Verlag, 2004.

Michelis S, Sewell H, Collares PM, et al. Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Ticks from Mainland Portugal. *Journal of Microbiology* 2000 June; 38 (6)

Persing DH, Smith TF, Tenover FC et al. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington: ASM press, 1993.

Rauter C, Mueller M, Diterich I, et al. Critical Evaluation of Urine-Based PCR Assay for Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical and Diagnostic Immunology* 2005 Aug; 12(8)

Reed KD. Laboratory Testing for Lyme Disease: Possibilities and Practicalities. *Journal of Clinical Microbiology* 2002 Feb; 40(2)

Reichl U, Wittwer C, Cockerill F. *Rapid Cycle Real-Time-PCR: Methods and Applications - Microbiology and Food Analysis*. New York: Springer Verlag, 2001.

ROCHE Molecular Systems. *The Evolution of PCR*. Roche Molecular Systems, Inc. (2003)

Somma M, Querci M. The Polymerase Chain Reaction (PCR), in Querci M, Jermini M and Eide GU (Eds.). *Training Cor on: The analysis od Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms – User manual.*

Steere AC, Coburn J and Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2004 Apr; 113 (8)

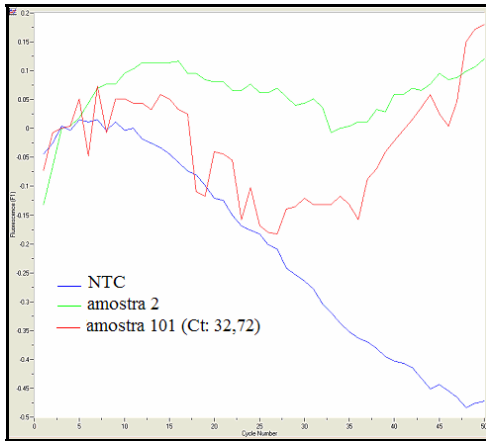
Younsi H, Sarih M, Jouda F, et al. Characterization of *Borrelia lusitaniae* Isolates Collected inTunisia and Marocco. *Journal of Clinical Microbiology* 2005 Apr.; 43(4)

## **ANEXOS**

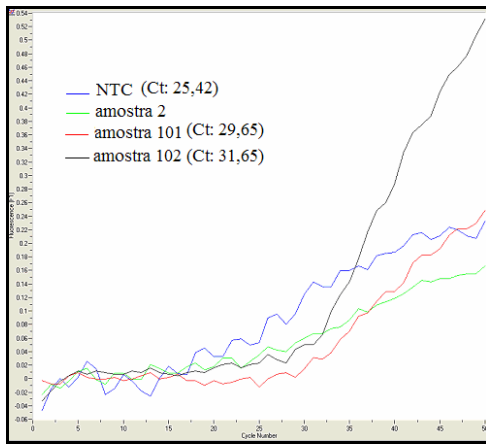
## **ANEXO I**

Fluorogramas dos resultados obtidos no LightCycler para todos os ensaios realizados no decorrer deste projecto (descritos na tabela 5).

ENSAIO 1

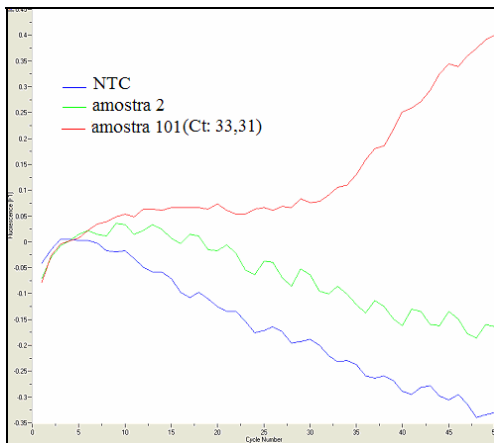


ENSAIO 3

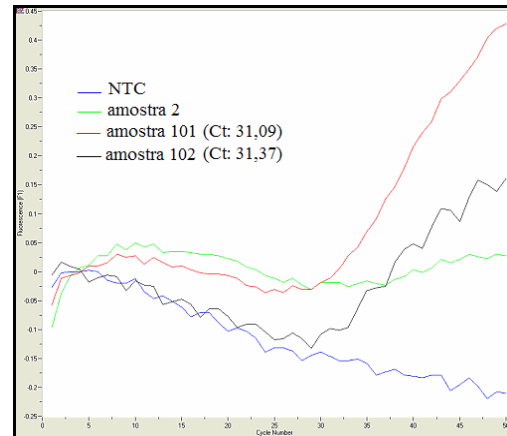


ENSAIO 5

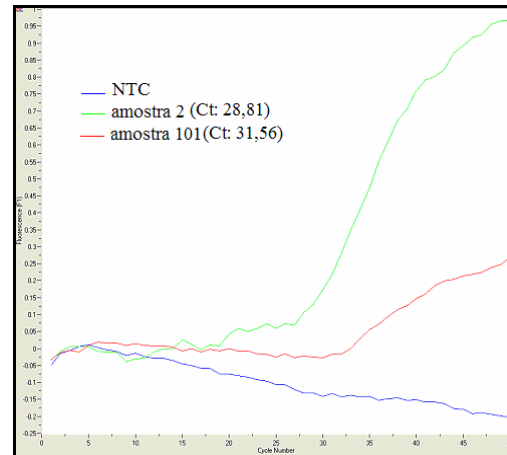
ENSAIO 2



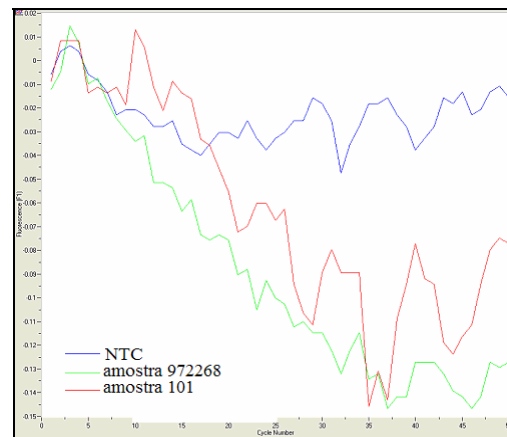
ENSAIO 4



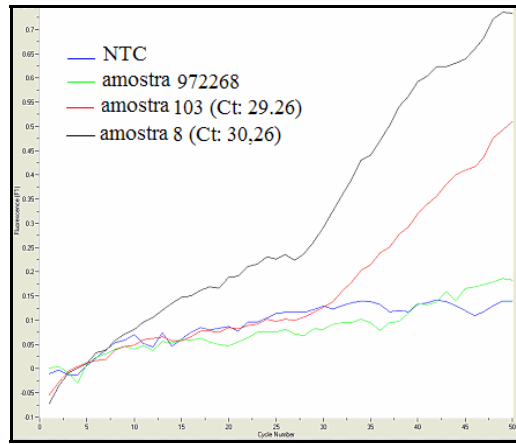
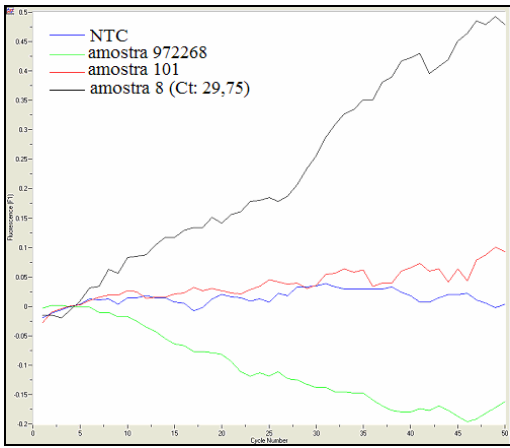
ENSAIO 6



ENSAIO 7

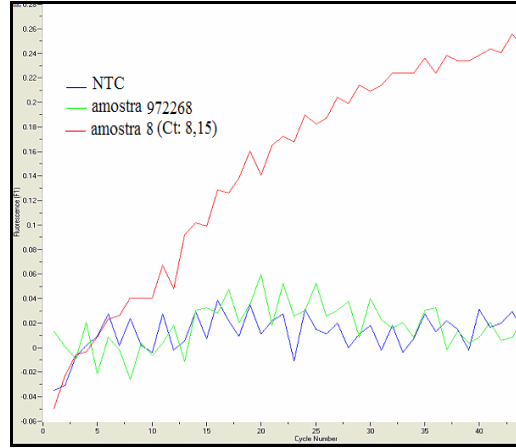
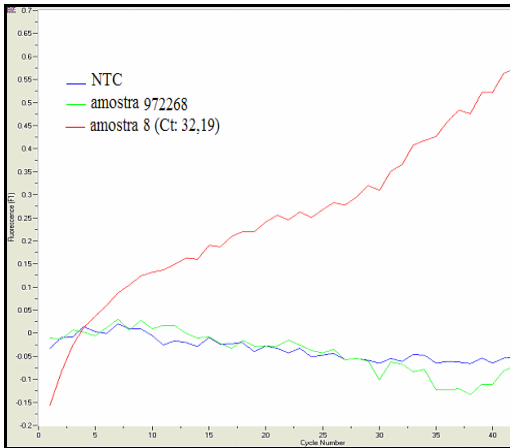


ENSAIO 9



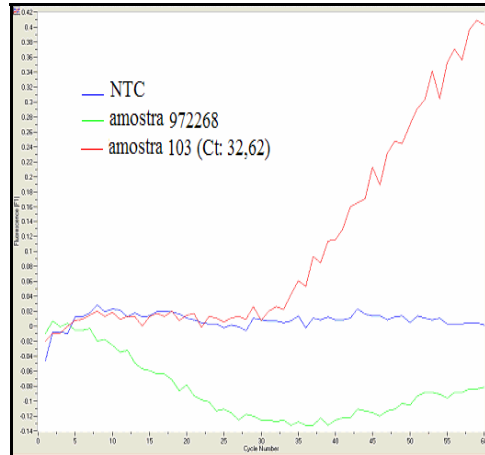
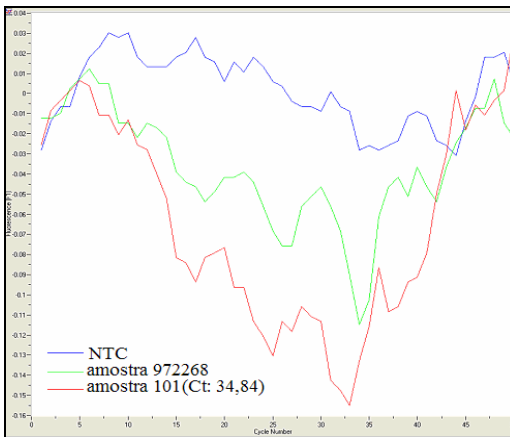
ENSAIO 11

ENSAIO 12



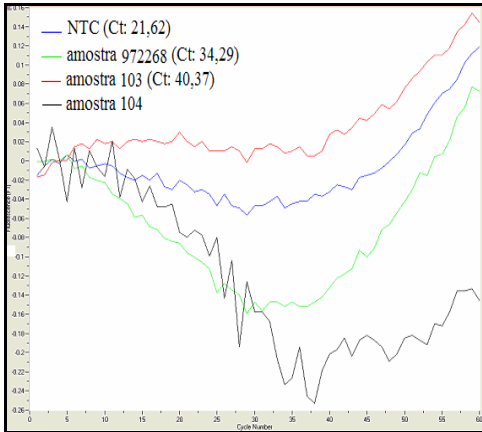
ENSAIO 8

ENSAIO 13

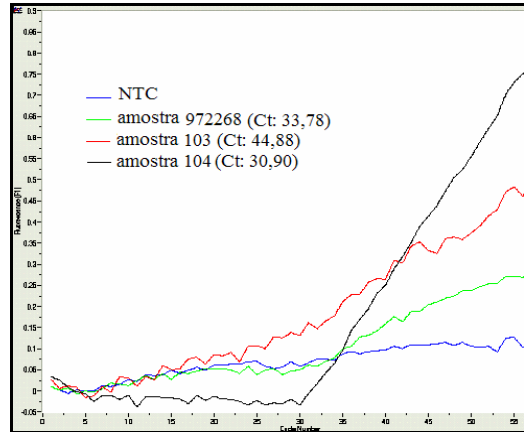


ENSAIO 10

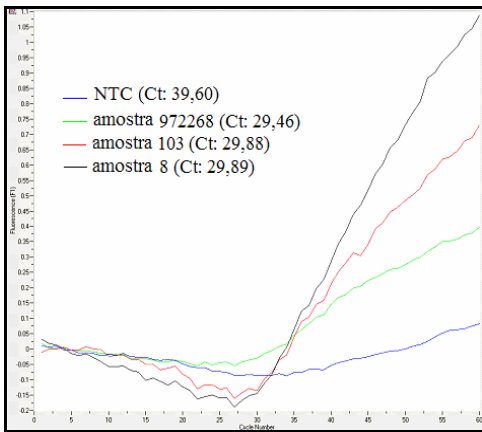
ENSAIO 15



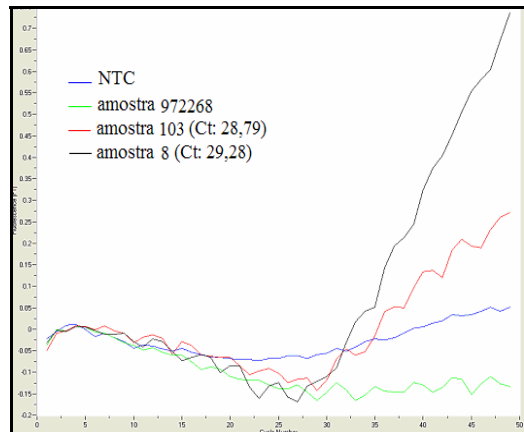
ENSAIO 16



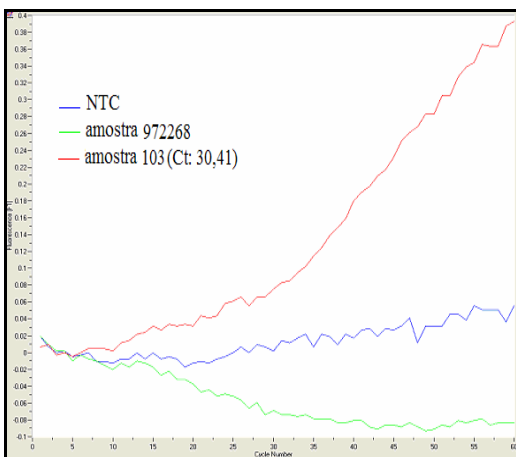
ENSAIO 17



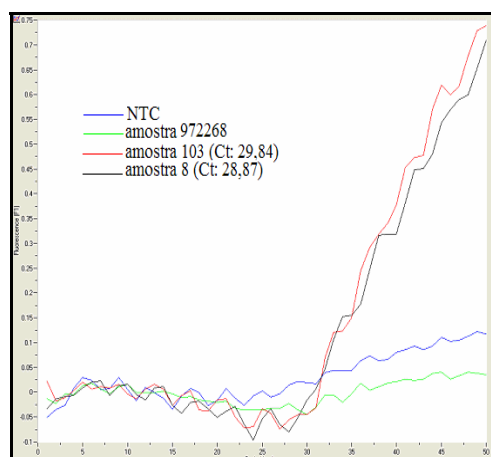
ENSAIO 18



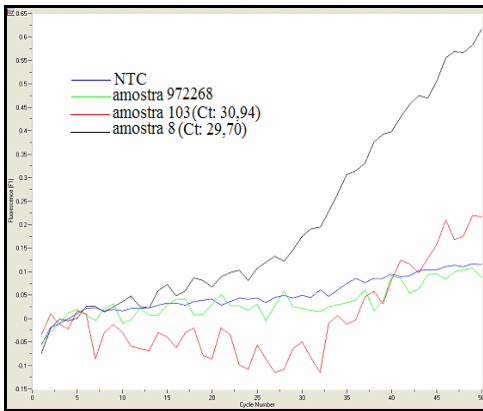
ENSAIO 14



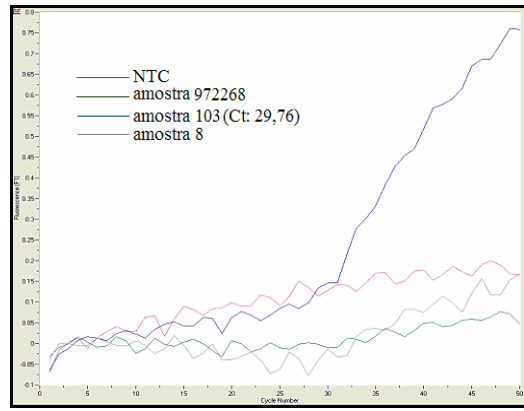
ENSAIO 19: [MgCl<sub>2</sub>] = 3,5 mM



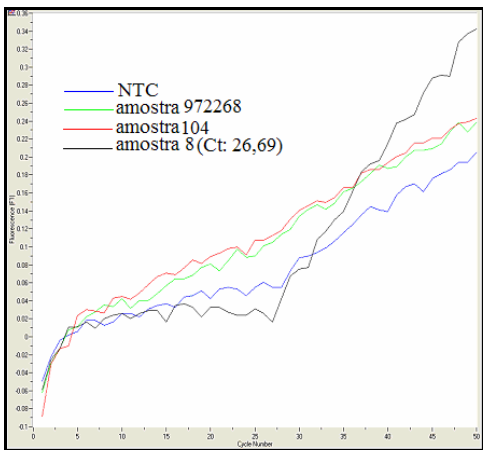
ENSAIO 20: [MgCl<sub>2</sub>] = 4,5 mM



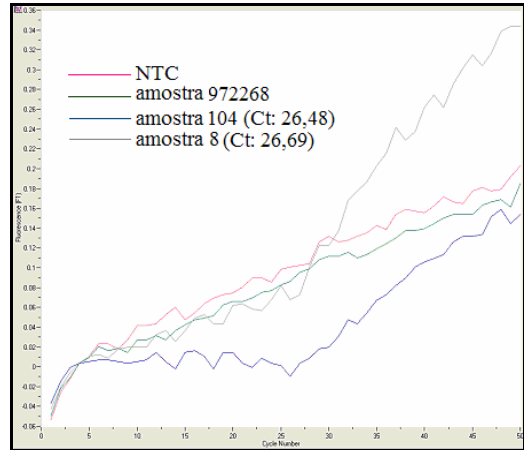
ENSAIO 20: [MgCl<sub>2</sub>] = 5,0 mM



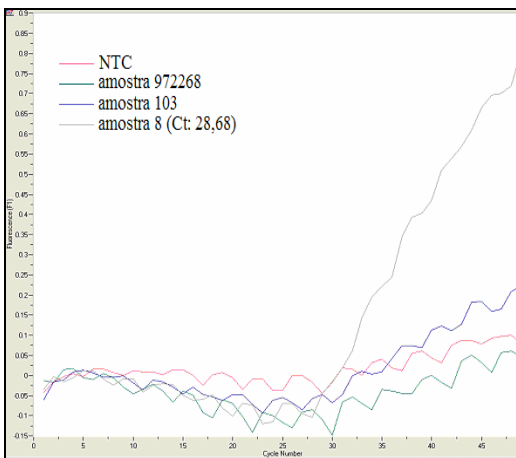
ENSAIO 21: [MgCl<sub>2</sub>] = 5,0 mM



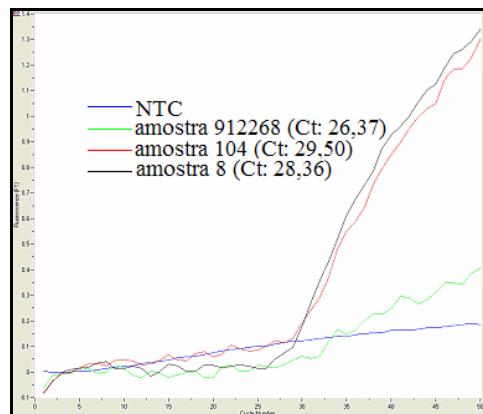
ENSAIO 21: [MgCl<sub>2</sub>] = 5,5 mM



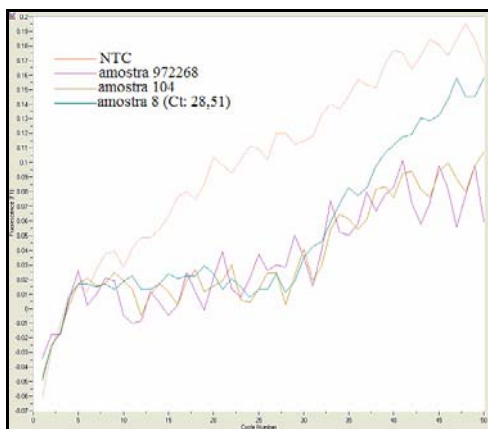
ENSAIO 19: [MgCl<sub>2</sub>] = 4,0 mM



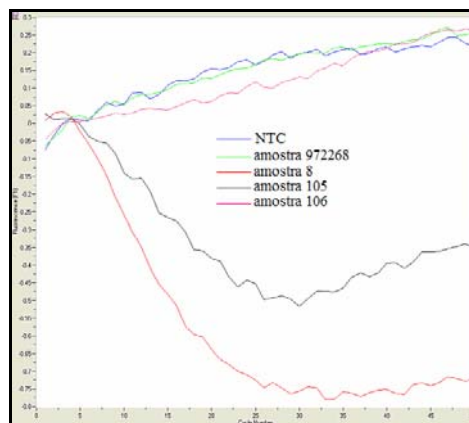
ENSAIO 22: [MgCl<sub>2</sub>] = 5,5 mM



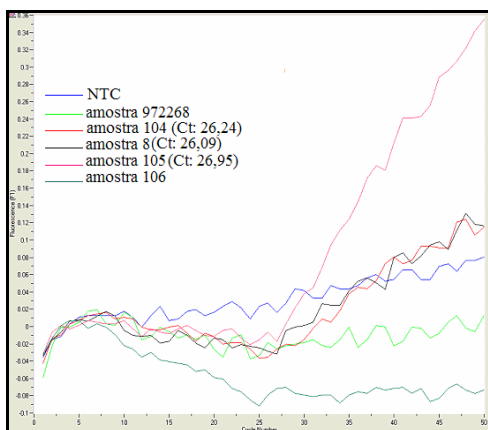
ENSAIO 22: [MgCl<sub>2</sub>] = 6,5 mM



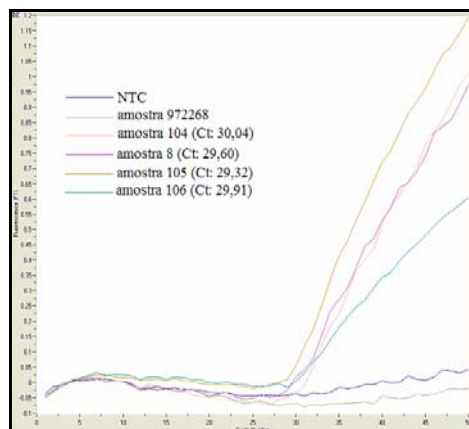
ENSAIO 23



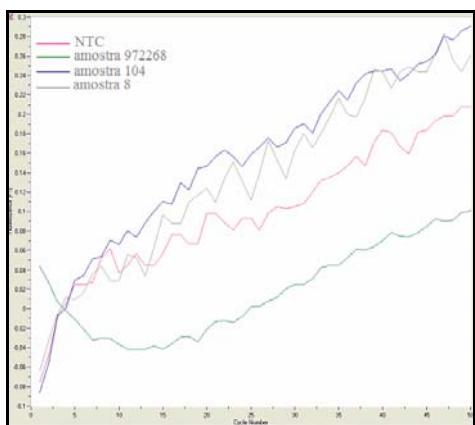
ENSAIO 24: [MgCl<sub>2</sub>] = 5,5 mM



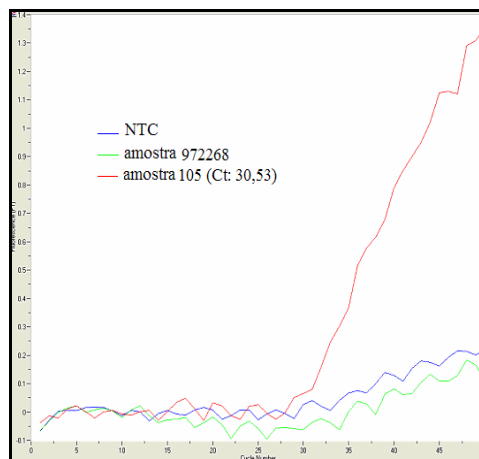
ENSAIO 24: [MgCl<sub>2</sub>] = 6,0 mM



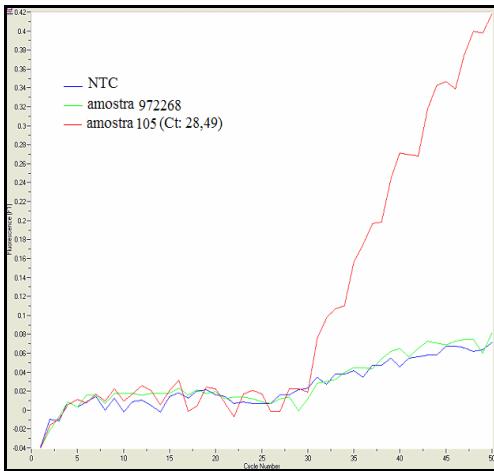
ENSAIO 22: [MgCl<sub>2</sub>] = 6,0 mM



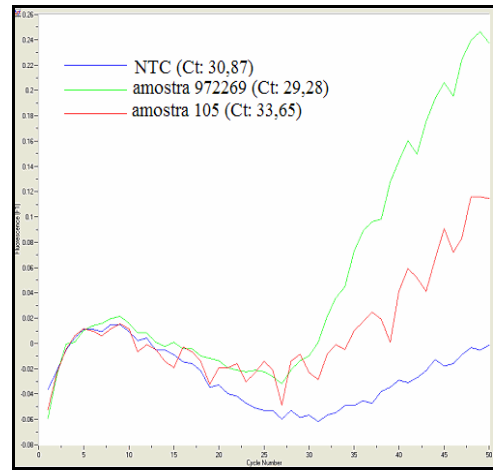
ENSAIO 25: [MgCl<sub>2</sub>] = 6,5 mM



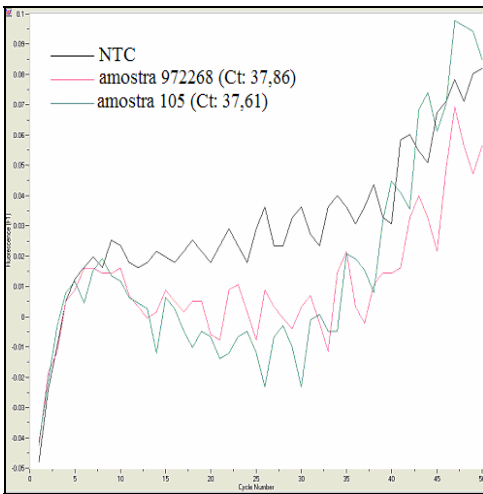
ENSAIO 26



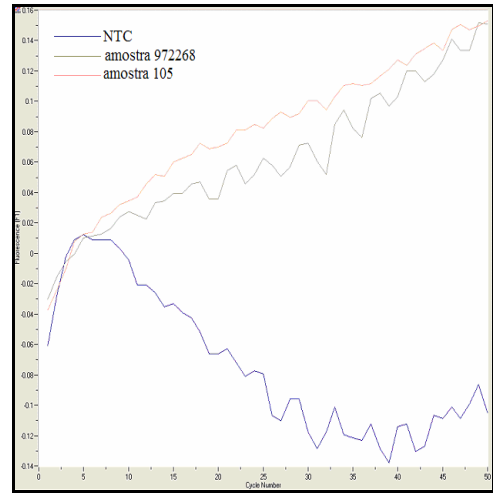
ENSAIO 27: [16s2a] = 0,8 µM



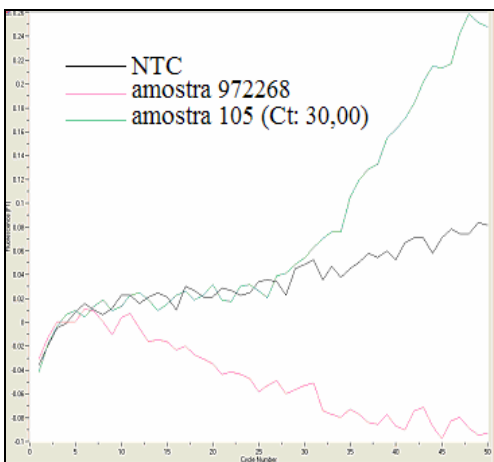
ENSAIO 27: [16s2a] = 0,7 µM



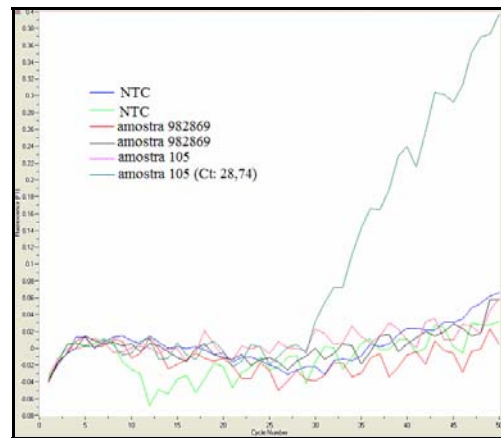
ENSAIO 25: [MgCl<sub>2</sub>] = 7,0 mM



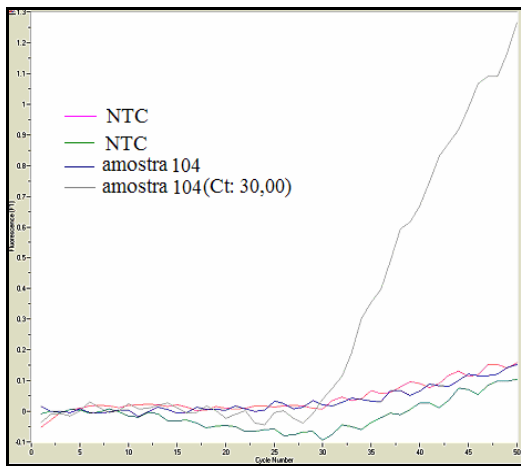
ENSAIO 28



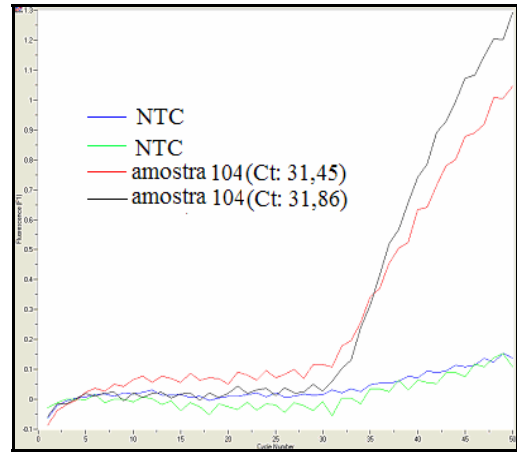
ENSAIO 27: [16s2a] = 0,9 µM



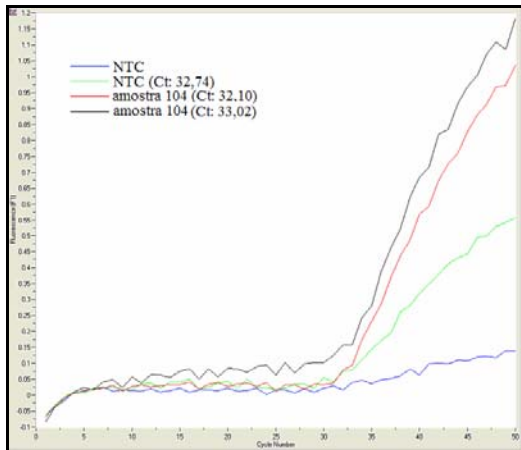
ENSAIO 29: [MgCl<sub>2</sub>] = 3,5 mM



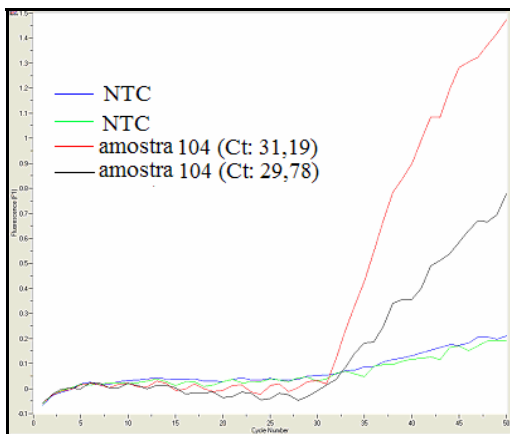
ENSAIO 30



ENSAIO 31



ENSAIO 29: [MgCl<sub>2</sub>] = 3,0 mM



## **ANEXO II**

Resultados do *Blastn* efectuado na NCBI para o *primer sense* e a base de dados de sequências humanas (Ficheiro: NCBI Blast\_BorrprimerS no CD).

### **ANEXO III**

Resultados do *Blastn* efectuado na NCBI para o *primer anti-sense* e a base de dados de sequências humanas (Ficheiro: *NCBI Blast\_BorrprimerA* no CD).

#### **ANEXO IV**

Resultados do *Blastn* efectuado na NCBI para o *primer anti-sense* e a base de dados de sequências humanas (Ficheiro: *NCBI Blast\_Borrprobe* no CD).

## **ANEXO V**

Resultados do *Blastn* efectuado na NCBI para os *primers* e sonda utilizados no trabalho a base de dados de sequências bacterianas [Ficheiro: NCBI Blast\_3 sequences (BorrProbe) no CD].

