

## ENSAIO MULTIPLEX qPCR-HRM SEM SONDA PARA A DISCRIMINAÇÃO DE CINCO ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

OLUWAGBEMIGA ADEMOLA DADA<sup>1</sup>; DIAGO DUTRA LIMA<sup>2</sup>; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA<sup>3</sup>; KAUÉ RODRIGUEZ MARTINS<sup>4</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA<sup>5</sup>; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN<sup>6</sup>

*Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,*

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas - doluwagbemiga@yahoo.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas - diagolima@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas - oliveira\_natasha@hotmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas - kauerodriguez@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas - rodrigocunha\_vet@hotmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas - odirad@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de relevância global causada por bactérias do gênero *Leptospira*, principalmente *L. interrogans* (HAGEDOORN et al., 2024). É altamente endêmica em regiões úmidas e subtropicais, como o Brasil, onde diversas espécies animais atuam como reservatórios e vetores (BROWNE et al., 2023). Em animais, provoca distúrbios reprodutivos que resultam em perdas econômicas significativas (SILVA et al., 2022).

A detecção e caracterização precisas de *Leptospira* em amostras clínicas são essenciais para a vigilância epidemiológica, o desenvolvimento de vacinas e o direcionamento de terapias (DE OLIVEIRA et al., 2022), além de contribuírem para a identificação de novas espécies e sorovares. Embora existam diversos protocolos moleculares descritos (AHMED et al., 2012; GAYATHRI et al., 2022; PACCE et al., 2022), poucos possibilitam a detecção direta de espécies de *Leptospira* a partir de material clínico.

Grande parte dessas técnicas moleculares apresenta alto custo, tempo de execução prolongado e limitações na diferenciação entre espécies patogênicas, o que tem incentivado a busca por métodos independentes de cultivo. Nesse contexto, o PCR em tempo real quantitativo (qPCR) combinado à análise de high-resolution melt (HRM) tem se destacado por permitir a comparação de dados entre diferentes laboratórios e países (NAZE et al., 2015). A HRM é uma abordagem econômica que, a partir da qPCR (qPCR-HRM), gera perfis de curvas de dissociação baseados em variações na sequência do DNA de fita dupla, oferecendo resultados em menos de duas horas, com alta especificidade e menor risco de contaminação.

A aplicabilidade da HRM já foi comprovada na diferenciação de *Babesia bovis* e *B. bigemina* (GIGLIOTTI et al., 2021), bem como na distinção entre espécies de *Leptospira* (PELÁEZ-SÁNCHEZ et al., 2017). Contudo, este último estudo relatou limitações na resolução de espécies filogeneticamente próximas, recomendando a adoção de marcadores genéticos adicionais para melhorar o poder discriminatório.

Apesar do potencial da HRM, são necessários estudos adicionais de validação para sua utilização como ferramenta diagnóstica na detecção direta de *Leptospira* em amostras clínicas, sobretudo quando a identificação em nível de espécie é fundamental. Neste estudo, aplicamos um ensaio multiplex de qPCR-HRM direcionado a três regiões genômicas distintas de *Leptospira*, visando superar limitações conhecidas quanto à sensibilidade, ao poder discriminatório e à rapidez diagnóstica. O desempenho do ensaio foi comparado ao sequenciamento de

Sanger para avaliar sua acurácia e especificidade. Em última instância, este trabalho busca desenvolver e validar uma ferramenta molecular rápida, confiável e de baixo custo para o diagnóstico da leptospirose, com potencial de aplicação tanto em ambientes clínicos quanto em condições de campo.

## 2. METODOLOGIA

Para este estudo, a padronização da técnica HRM para detecção de *Leptospira* envolveu seis cepas de referência obtidas do CDTEC/UFPel — cinco patogênicas e uma saprofítica. O DNA genômico foi extraído de culturas utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Três regiões gênicas foram selecionadas pelo seu potencial discriminatório. As sequências foram alinhadas com o Clustal W, e os primers foram desenhados no software Primer3, com verificação subsequente de especificidade e integridade estrutural por meio das ferramentas NCBI Primer-BLAST e Oligo-Analyzer Tool (IDT).

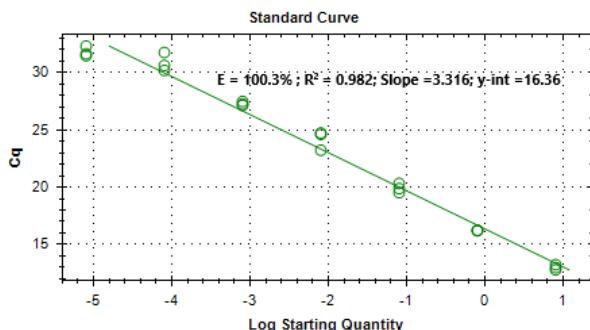
Cada par de primers foi otimizado por qPCR em gradiente para determinar a temperatura ideal de anelamento. Curvas padrão foram geradas utilizando DNA genômico de *L. kirschneri* a 8 ng/ $\mu\text{L}$ , possibilitando o cálculo da eficiência de amplificação, da faixa dinâmica e do limite de detecção (LOD). A sensibilidade analítica e o LOD foram determinados por diluições seriadas na base 10, variando de  $1,6 \times 10^3$  a  $1,6 \times 10^{-3}$  cópias genômicas/ $\mu\text{L}$ , com cada ponto testado em triplicata.

A qPCR–HRM multiplex foi conduzida utilizando 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer e o master mix BRYT Green® Dye (Promega). As reações foram realizadas no sistema CFX Opus 96 (Bio-Rad), e a análise das curvas de melting foi efetuada no software Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad). A discriminação dos amplicons baseou-se nas diferenças de temperatura de fusão, sendo calculadas a média e o desvio padrão para confirmar a diferenciação em nível de espécie.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco pares de primers foram selecionados com base em sua especificidade e eficiência de amplificação em reações monoplex. Ensaios de PCR em gradiente indicaram desempenho ótimo a uma temperatura de anelamento de  $56^{\circ}\text{C}$ , a qual foi adotada para as reações multiplex. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose.

As curvas padrão, geradas a partir de diluições seriadas de DNA de uma única espécie de *Leptospira*, apresentaram alta linearidade ( $R^2 \geq 0,98$ ) e eficiências de amplificação variando entre 90% e 100,3% (Fig. 1). O conjunto de primers para o gene 16S rRNA detectou DNA de *Leptospira* até a sexta diluição decimal ( $\sim 0,016$  pg/ $\mu\text{L}$ ;  $\sim 3,2$  cópias genômicas por reação), demonstrando sensibilidade superior ao limite de 10 pg relatado por PELÁEZ-SÁNCHEZ et al. (2017). Embora PÉREZ et al. (2020) tenham reportado um limite de detecção de aproximadamente três cópias genômicas por reação, o método aqui descrito apresenta a vantagem adicional de permitir a genotipagem pós-amplificação sem necessidade de sondas fluorescentes. O limite de detecção (LOD) para os genes *secY* e *lipL32* foi de 0,16 pg/ $\mu\text{L}$ .

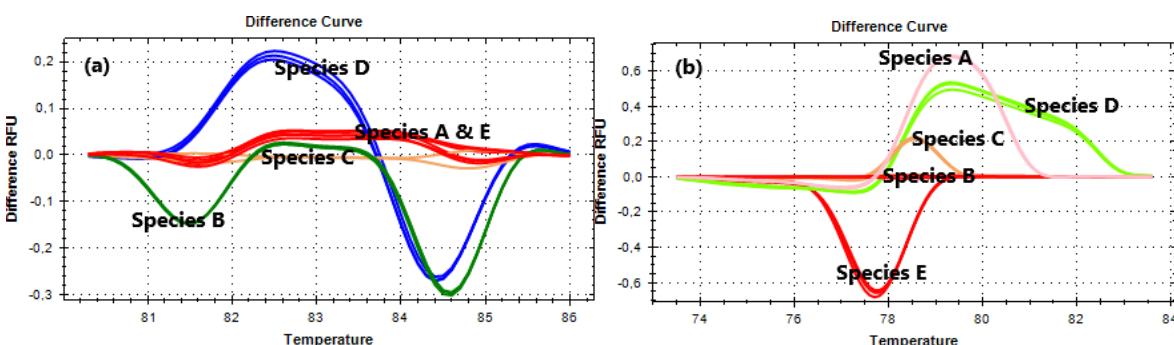


**Fig 1:** Curva padrão mostrando a eficiência de amplificação e a linearidade para o gene 16S

Nas reações monoplex, as temperaturas de melting ( $T_m$ ) foram consistentes entre os alvos amplificados, variando aproximadamente de 77 a 85 °. Nas reações multiplex, os três alvos foram amplificados com sucesso em um único ensaio, apresentando picos de melting bem definidos e sem sobreposição.

O ensaio multiplex de HRM, utilizando BRYT Green® Dye, permitiu diferenciar cinco espécies de *Leptospira* com níveis de confiança na discriminação variando de 98,5% a 100% (Fig. 2a e 2b). Embora a maioria das espécies tenha apresentado perfis de melting distintos, *L. kirschneri* e *L. noguchi* foram agrupadas pelo software Precision Melt Analysis™ possivelmente devido a semelhanças no comportamento térmico global (Fig. 2a). Entretanto, a análise detalhada das curvas derivadas de melting revelou uma diferença crucial: ambas as espécies compartilhavam dois picos em comum, mas *L. kirschneri* apresentava consistentemente um terceiro pico, em temperatura mais baixa, ausente em *L. noguchi*.

Destaca-se que essa resolução em nível de espécie foi obtida no formato duplex, sem a necessidade de marcadores genéticos adicionais (Fig. 2b). Em contraste, o ensaio triplex proporcionou maior cobertura, mas apresentou menor capacidade de discriminação entre cepas filogeneticamente próximas.



**Fig 2:** Curvas de diferença de HRM para cinco espécies patogênicas de *Leptospira*. (a) Perfis de melting das cinco espécies patogênicas de *Leptospira* com base nos genes *secY*, *lipL32* e 16S *rRNA*. (b) Perfis de melting das cinco espécies patogênicas de *Leptospira* com base nos genes *secY* e *lipL32*.

Para aprimorar a interpretabilidade, as temperaturas de melting foram categorizadas em faixas alta, média e baixa, permitindo distinguir *L. kirschneri* com base em seu padrão de  $T_m$ , caracterizado por um pico exclusivamente mais baixo. Essa estratégia aumentou o poder discriminatório do ensaio e evidenciou sua sensibilidade a diferenças genéticas sutis. Ainda assim, melhorias adicionais podem ser obtidas com a utilização do corante EvaGreen® Dye, que apresenta

maior resolução e menor inibição da PCR em comparação ao BRYT Green® Dye. A futura otimização do protocolo com EvaGreen® Dye poderá ampliar a capacidade de discriminação entre espécies filogeneticamente próximas de *Leptospira* em ensaios baseados em HRM.

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo apresenta um ensaio multiplex de qPCR-HRM, sem uso de sondas, direcionado a três regiões genômicas, capaz de detectar e diferenciar simultaneamente cinco espécies patogênicas de *Leptospira*. A abordagem demonstrou alta especificidade, sensibilidade e capacidade discriminatória, aliadas a uma relação custo-benefício favorável, o que a torna aplicável tanto em ambientes clínicos quanto em condições de campo. Os resultados obtidos indicam que este método representa uma ferramenta promissora para o diagnóstico rápido e preciso da leptospirose, com potencial para aprimorar a vigilância epidemiológica e apoiar estratégias de controle da doença.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BROWNE, E. S. et al. Prevalence of human leptospirosis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington (DC), v. 47, n. e126, p. e126, 2023.
- 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.
- GAYATHRI, R.; ARCHANA, V.; RAMYA, M. Molecular diagnostic methods for the detection of leptospirosis. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Bhopal, v.16, n.2, p.782–795, 2022.
- GIGLIOTTI, 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.
- 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.
- 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.
- PÉREZ, L. J. et al. A validated multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of infectious *Leptospira* spp.: a novel assay for the detection and differentiation of strains from both pathogenic groups I and II. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 457, 2020.
- SILVA, J. F. et al. Leptospirosis in dairy cattle from Southern Brazil – risk factors. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 50, 2022